

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2016 setembro; 23(3): 318-521

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ISSN Impresso 0102-5716

ISSN Eletrônico 2178-3764

Botucatu - SP – Brasil

Veterinária e Zootecnia

ISSN Impresso 0102-5716
ISSN Eletrônico 2178-3764

VETERINÁRIA E ZOOTECCIA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UNESP – Campus de Botucatu
18618-970 – Dist. Rubião Jr. – Botucatu – SP – Brasil
Portal: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>
E-mail: vetzootecnia@fmvz.unesp.br
Tel. +55 14 3880 2094

Publicação trimestral
Solicita-se permuta / *Exchange desired*
Biblioteca do Campus de Botucatu
18618-970 – Distrito de Rubião Júnior – Botucatu – SP – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Veterinária e Zootecnia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. – Vol. 1, n. 1(1985)- . – Botucatu, SP : FMVZ, 1985

Trimestral
Texto em português/inglês/espanhol
Descrição baseada em: Vol. 23, n.1, mar. (2016)
ISSN Impresso 0102-5716
ISSN Eletrônico 2178-3764

1. Medicina veterinária. 2. Zootecnia. I. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

Os artigos publicados na *Revista VETERINÁRIA E ZOOTECCIA* são indexados por:
Lilacs, PERIÓDICA – Índice de Revistas Latinoamericanas em Ciências, Cambridge
Scientific Abstracts, CAB Abstracts e GALE- Cengage Learning.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Administração Geral da UNESP

Reitor

Prof. Dr. Julio Cezar Durigan

Vice-Reitor

Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge

Pró-Reitora Interina de Pesquisa

Prof^a Dr^a Maysa Furlan

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eduardo Kokubun

Pró-Reitor de Graduação

Prof. Dr. Laurence Duarte Colvara

Pró-Reitor de Extensão Universitária

Prof^a Dr^a Mariângela Spotti Lopes Fujita

Pró-Reitor de Administração

Prof. Dr. Carlos Antonio Gamero

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Administração da FMVZ

Diretor

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Vice-Diretor

Prof^a Dr^a Maria Denise Lopes

Botucatu
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FMVZ
2016

EXPEDIENTE**Comissão Editorial**

Helio Langoni (Editor chefe)
Márcio Garcia Ribeiro
André Mendes Jorge

Assessoria Técnica

Editoração Eletrônica: José Luis Barbosa de Souza, Wellington Ricardo Guerra

Normalização Bibliográfica: Rinaldo José Ortiz

Revisor – Espanhol: Selene Daniela Babboni (FMVZ – UNESP/Botucatu)

Secretaria: Apoio: Wellington Ricardo Guerra

A Revista **Veterinária e Zootecnia**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Campus de Botucatu, publica artigos científicos originais, artigos de revisão bibliográfica, relatos de casos e comunicações curtas, referentes às áreas de Medicina Veterinária e de Zootecnia, com periodicidade trimestral, em português, espanhol, ou inglês, sendo os conceitos e opiniões emitidas, de responsabilidade exclusiva dos autores. Poderá editar e disponibilizar em sua página na internet, suplementos de eventos científicos.

A publicação está condicionada à avaliação preliminar do presidente da Comissão Editorial, que analisa o mérito e os aspectos formais do trabalho, de acordo com a categoria do artigo submetido e normas editoriais estabelecidas. Se adequado, adotando-se o mérito da avaliação por pares, é encaminhado para dois assessores (relatores), de acordo com a área. Os pareceres são mantidos sob sigilo absoluto, não havendo possibilidade de identificação entre autores e pareceristas. Os artigos não publicados são devolvidos.

Os trabalhos devem ser encaminhados pela página da internet:
<http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

Prof. Dr. Helio Langoni

Revista “Veterinária e Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Doutor Walter Mauricio Correa s/n - 18618-681

Dist. Rubião Junior – SP – Brasil

Corpo Editorial

- Aristeu Vieira da Silva (UEFS/Feira de Santana)
Antônio Felipe P. F. Wouk (UFPR – Escola de Agronomia e Veterinária)
Benedito Correa (ICB – USP)
Carlos Robles (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – Argentina)
Geraldo Heleno Silveira Alves (UFMG – Escola de Veterinária)
Guilherme J. M. Rosa (School of Veterinary Medicine/Madison – Wisconsin – USA)
Hélio Autran de Moraes (Oregon State University - College of Veterinary Medicine - USA)
Italmar Teodorico Navarro (UEL/Londrina)
José Eduardo P. Santos (University of Florida – USA)
Juan A. M. Hirose (Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal - México)
Julio César Cambraia Veado (UFMG – Escola de Veterinária)
Leonardo José Richtzenhain (FMVZ – USP)
Luiz Cláudio Lopes Correia da Silva (FMVZ – USP)
Luciano dos Santos Bersot (UFPR/Palotina)
Maria Inácia Corrêa de Sá (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Portugal)
Maria Julia B. F. Flaminio (Cornell University – Cornell – USA)
Maurício Costa Alves da Silva (UFBA/Salvador)
Ney Luiz Pippi (UFMS/Santa Maria)
Pamela Ruegg (School of Veterinary Medicine/Madison – Wisconsin – USA)
Paulo de Camargo Duarte (Colorado State University – USA)
Paulo Roberto Leme (USP – FZEA – Pirassununga)
Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE/Recife)
Roberto Mauricio Carvalho Guedes (UFMG – Escola de Veterinária)
Rogério de Paula Lana (UFV/Viçosa)
Rômulo Cerqueira Leite (UFMG – Escola de Veterinária)
Solange Maria Gennari (FMVZ – USP)
Walter Motta Ferreira (UFMG – Escola de Veterinária)

SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

| | |
|---|-----|
| EDITORIAL | 325 |
| ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN | |
| MANEJO ALIMENTAR DE CAPRINOS E OVINOS NOS TRÓPICOS / DIETARY MANAGEMENT OF SHEEP AND GOATS IN THE TROPICS / MANEJO DE LA DIETA DE OVEJAS Y CABRAS EN EL TRÓPICO. Marcos Cláudio Pinheiro Rogério, Alexandre Ribeiro Araújo, Roberto Cláudio Fernandes Franco Pompeu, André Guimarães Maciel e Silva, Eziquiel de Moraes, Humberto de Queiroz Memória, Delano de Sousa Oliveira..... | 326 |
| MEGAESÔFAGO SECUNDÁRIO À MIASTENIA GRAVIS / MEGAESOPHAGUS SECONDARY TO MYASTHENIA GRAVIS / MEGAESÓFAGO SECUNDARIO A LA MIASTENIA GRAVIS.. Luiz Henrique de Araújo Machado, Natália Caroline Nalesso de Castro, Laura Carolina Barbosa, Fabíola Soares Zahn | 347 |
| ASPECTOS GERAIS SOBRE A MASTITE BOVINA CAUSADA POR <i>Mycoplasma spp.</i> / GENERAL ASPECTS ABOUT BOVINE MASTITIS CAUSED BY <i>Mycoplasma spp.</i> / ASPECTOS GENERALES SOBRE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR <i>Mycoplasma spp.</i> Nathália Brancato Junqueira, Hélio Langoni | 356 |
| RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO | |
| REMAINING OF THE YOLK SAC / SACO VITELÍNICO REMANESCENTE / REMANENTE DE SACO VITELINO. Gabriela Amorim Campos, Victor Filgueiras Cruz Garcia, Milena da Silva Machado, Viciany Erique Fabris, Maria Jaqueline Mamprim, Nereu Carlos Prestes | 365 |
| EPITELIOGÊNESE IMPERFEITA EM SUÍNOS - RELATO DE CASO / EPITHELIOGENESIS IMPERFECTA IN THE SWINE- CASE REPORT / EPITELIOGENESE DEFECTUOSO EN CERDOS- RELATO DEL CASO. Luara Medianeira de Lima Schlösser, Carlos Augusto Rigon Rossi, Marcelo Soares, Matheus Schardong Lucca, Mauricio da Cruz Franco, Magali Fernandes de Oliveira, Vagner Luis Ferrari Martins..... | 370 |
| ENTENDENDO AS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM UM QUADRO DE PIOMETRA: ESTUDO DE UM RELATO DE CASO / UNDERSTANDING HEMATOLOGIC CHANGES IN A PYOMETRA FRAME: STUDY OF A CASE REPORT / LA COMPRESIÓN DE LOS CAMBIOS HEMATOLÓGICOS A UN SIGNO CLINICO DE PIOMETRA: ESTUDIO DE UN CASO. Pâmela Ayres Martinuzzi, Helen Cabaldi Franz, Thaianne Albuquerque, Letícia Reginato Martins, Carmen Lucia Garcez Ribeiro, Ana Raquel Mano Meinerz..... | 375 |
| O SUCESSO DA NUX VOMICA EM TRÊS CASOS DE CÃES COM INJÚRIA GÁSTRICA POR ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL / THE SUCCESS OF NUX VOMICA IN THREE CASES OF DOGS WITH GASTRIC INJURY BY NON-STEROIDAL ANTIINFLAMMATORIES / EL EXITO DE NUX VOMICA EN TRES PERROS CON LESIONES GÁSTRICAS POR ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS. Maria Eugenia Carretero, Nilson Roberti Benites..... | 380 |
| LEIOMIOSSARCOMA VESICAL EM CADELA - RELATO DE CASO / BLADDER LEIOMYOSARCOMA IN DOG - CASE REPORT / LEIOMIOSARCOMA DE VEJIGA EN PERRA - REPORTE DE UN CASO. Vivian Lima de Souza, Cristiane de Abreu Estanislau, José Joaquim Tilton Ranzani, Bruno Watanabe Minto, Leonardo Delatorre Kairalla, Carina Marchiori Carvalho, Luciana Moura Campos Pardini, Débora Rodrigues dos Santos Barone, Maria Jaqueline Mamprim, Cláudia Valéria Seullner Brandão | 385 |

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

- SENSORY ATTRIBUTES OF VEAL MEAT RECEIVING DIFFERENT LIQUID DIETS / ATRIBUTOS SENSORIAIS DA CARNE DE VITELLO RECEBENDO DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS / ATRIBUTOS SENSORIALES DE CARNE DE TERNERA RECIBIENDO DIFERENTES DIETAS LIQUIDAS.** Patrícia de Oliveira Lima, Leds Lene dos Santos Araujo, Renata Nayhara de Lima, Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis, Antonia Lucivânia de Sousa Monte, Kátia Tatiana de Lima Lopes, Ana Paula Pinheiro de Assis, Salenilda Soares Firmino.....391
- SOROPREVALÊNCIA E PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM FELÍDEOS SELVAGENS PROCEDENTES DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL / SEROPREVALENCE AND RESEARCH OF OOCYSTS *Toxoplasma gondii* IN WILD FELINES FROM PARA STATE, BRAZIL / SEROPREVALENCIA Y BÚSQUEDA DE OOCISTES DE *Toxoplasma gondii* EN FELINOS SILVESTRES EN EL ESTADO DE PARÁ, BRASIL.** Carolina Costa Silva, André Marcelo Conceição Meneses, Carla Cristina Guimarães de Moraes, Ediclei Lima do Carmo, Hélio Langoni, Rodrigo Costa da Silva, Helena Muta Hotta Pancieri, Bruno Rocha Martins, Nazaré Fonseca de Souza.....400
- TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: ANÁLISE DA CASUÍSTICA 2008-2014 NO HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU/ CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR: CASUISTIC ANALISIS OF 2008-2014 AT THE VETERINARY HOSPITAL OF BOTUCATU / TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO: ANÁLISIS DE CASOS DE 2008-2014 EN EL HOSPITAL VETERINARIO DE BOTUCATU.** Haline Ballesterio Fêo, Luis Mauricio Montoya Floréz, Noeme Sousa Rocha.....409
- AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS LINFONODOS AXILARES E INGUINAIS SUPERFICIAIS EM CADELAS (*Canis familiaris*) SUBMETIDAS À MASTECTOMIA TERAPÊUTICA / HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF AXILLARY AND SUPERFICIAL INGUINAL LYMPH NODES IN BITCHES (*Canis familiaris*) UNDERWENT TO THERAPY MASTECTOMY / EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS AXILAR Y SUPERFICIE INGUINAL EN PERRAS (*Canis familiaris*) DEBAJO MASTECTOMÍA TERAPÉUTICA.** Tábata Maués, Maria de Lourdes Gonçalves Ferreira, Ana Maria Reis Ferreira, Juliana da Silva Leite.....419
- PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA A DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) DO ESTADO DO PARÁ / ANTIBODIES AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) HERDS FROM PARÁ STATE/ ANTICUERPO CONTRA LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN GANADO BUFALO (*BUBALUS BUBALIS*) ESTADO PARA, BRASIL.** René Ribeiro da Silva, Silvio Orlan de Castro Chaves, Onel Solano Garcia, Hilma Lúcia Tavares Dias430
- AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA INATIVAÇÃO DE LEISHMANIA EM SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUÇÃO / ACTION OF ULTRAVIOLET LIGHT AND RIBOFLAVIN IN THE INACTIVATION OF LEISHMANIA IN CANINE BLOOD STORED IN BAGS FOR TRANSFUSION / ACCIÓN DEL LUZ UV Y RIBOFLAVINA EN INACTIVACIÓN DA LEISHMANIA EN SANGRE CANINO MANTENIDO EN BOLSAS DE TRANSFUSIÓN.** Soraya Regina Sacco, Cesar Rodrigo de Souza Surian, Rodrigo Costa da Silva, Hélio Langoni, Mary Marcondes, Raimundo Souza Lopes439
- PREVALÊNCIA E IMPACTO ECONÔMICO DO PRODUTOR DECORRENTE DA RETENÇÃO DE PLACENTA EM REBANHOS LEITEIROS DA AGRICULTURA FAMILIAR, DO SUDOESTE PARANAENSE / PREVALENCE AND ECONOMIC IMPACT OF PRODUCER ARISING OUT OF RESTRAINT IN SHEEP PLACENTA DAIRY OF FAMILY FARM, SOUTHWEST PARANAENSE / PREVALENCIA E IMPACTO ECONÓMICO DEL PRODUCTOR DERIVADOS DE RETENCIÓN PLACENTA EN REBAÑO LECHERO DE AGRICULTURA FAMILIAR, SUROESTE PARANAENSE.** Fabricio Bernardi, Marina Gabriela Possa, Adalgiza Pinto Neto, Claudemir Weber, Guilherme Oberlender453

- Crotalus durissus cascavella VENOM TOXICITY TO MAMMALIAN CELLS / TOXICIDADE DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella* EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS / TOXICIDAD DEL VENENO DE *Crotalus durissus cascavella* EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.** Lucelina da Silva Araújo, Danilo Damasceno Rocha, Daniel Araújo Viana, João Alison de Moraes Silveira, Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos-Filho, Diego Veras Wilke, Diva Maria Borges-Nojosa, Claudia do O' Pessoa, Manoel Odorico de Moraes, Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.....465
- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Mycobacterium fortuitum* ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA / DETERMINATION OF *Mycobacterium fortuitum* CONCENTRATION BY SPECTROPHOTOMETRY / DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Mycobacterium* POR ESPECTROFOTOMETRÍA.** Simone de Carvalho Balian, Sandra Abelardo Sanches476
- EVOLUÇÃO DAS TAXAS DE VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE BOVINA SEGUNDO AS ÁREAS DE RISCO PARA FEBRE AFTOSA NO ESTADO DO PARÁ / BOVINE BRUCELLOSIS VACCINATION RATES EVOLUTION IN DIFFERENT FOOT AND MOUTH DISEASE RISK-RATING REGIONS IN PARÁ STATE, BRAZIL / EVOLUCIÓN DE LAS TASAS DE VACUNACIÓN CONTRA LA BRUCELOSIS DE ACUERDO CON LAS ZONAS DE RIESGO PARA FIEBRE AFTOSA EN EL ESTADO DE PARÁ.** Andrea Ferreira Nobre, Susiclay Barros Neto, Glaucio Antonio da Rocha Galindo, Flávia da Cunha Rodrigues, Giovani Luidy Girardeli, Ana Julia Silva e Alves, Márcia Marinho, Luzia Helena Queiroz.....483
- SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR CANINE LEPTOSPIROSIS IN THE COAST OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL / INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSE CANINA NO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL / ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSIS CANINA EN LA COSTA DEL ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.** Rodrigo Costa da Silva, Vanessa Yuri de Lima, Aristeu Vieira da Silva, Luiz Carlos de Souza, Helio Langoni495
- LONG BONE FRACTURES IN CATS: A RETROSPECTIVE STUDY / FRATURAS DE OSSOS LONGOS EM GATOS: ESTUDO RETROSPECTIVO / FRACTURAS DE LOS HUESOS LARGOS EN LOS GATOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO.** Catarina Borges Cardoso, Sheila Canevese Rahal, Felipe S. Agostinho, Maria Jaqueline Mamprim, Rogério R. Santos, Ednaldo S. Filho, Ana Carolina Mortari, Frederico O. B Monteiro.....504

EDITORIAL

A AGROPECUÁRIA E O AGRONEGÓCIO

A agropecuária é considerada como um conjunto de atividades ligadas à agricultura e à pecuária. É relevante para a humanidade e também para a economia mundial, pois a sua produção se destina ao consumo humano e ao comércio. Esse aspecto considerado muito positivo é por outro lado questionado, em função dos problemas ambientais oriundos da sua expansão e utilização de métodos para o cultivo e criação de diferentes espécies de animais de interesse zootécnico. Um dos problemas se refere ao desmatamento. A retirada da cobertura vegetal reduz a biodiversidade, extingue espécies animais e vegetais, propicia a desertificação, erosão, redução de nutrientes do solo, além de contribuir para o aquecimento global.

O agronegócio brasileiro é uma atividade próspera, é moderno, eficiente e competitivo. É a mola propulsora da economia brasileira, sendo responsável por mais de 30% do produto interno bruto, mais de 40% das exportações totais e mais de 37% dos empregos brasileiros. Além de produtos vegetais como o café, açúcar, soja e sucos de frutas, lidera o ranking de vendas de carne bovina, suína e de frango.

A área de Ciências Agrárias está diretamente relacionada com essa temática e, assim sendo, os profissionais médicos veterinários são imprescindíveis para o sucesso do agronegócio, bem como os zootecnistas, que juntamente ostentam os conhecimentos a serem aplicados para o êxito da atividade.

O presente número da Revista Veterinária e Zootecnia traz artigos interessantes inéditos, contribuindo com o desenvolvimento científico em diferentes áreas do conhecimento. Como artigos de revisão: Manejo alimentar de caprinos e ovinos nos trópicos; Megaesôfago secundário à miastenia gravis e Aspectos gerais sobre a mastite bovina causada por *Mycoplasma spp.* Os relatos de caso: Remaining of the yolk sac; Epiteliogênese imperfeita em suínos; Entendendo as alterações hematológicas em um quadro de piometra: estudo de um relato de caso; O sucesso da *Nux vomica* em três casos de cães com injúria gástrica por anti-inflamatório não esteroideal e Leiomiossarcoma vesical em cadela. Os artigos originais: Sensory attributes of veal meat receiving different liquid diets; Soroprevalência e pesquisa de oocistos de *Toxoplasma gondii* em felídeos selvagens procedentes do estado do Pará, Brasil; Tumor venéreo transmissível canino: análise da casuística 2008-2014 no hospital veterinário de Botucatu; Avaliação histopatológica dos linfonodos axilares e inguinais superficiais em cadelas (*Canis familiaris*) submetidas à mastectomia terapêutica; Pesquisa de anticorpos contra a diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis*) do estado do Pará; Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação de leishmania em sangue canino conservado em bolsas para transfusão; Prevalência e impacto econômico do produtor decorrente da retenção de placenta em rebanhos leiteiros da agricultura familiar, do sudoeste paranaense; *Crotalus durissus cascavella* venom toxicity to mammalian cells; Determinação da concentração de *Mycobacterium fortuitum* por meio da espectrofotometria; Evolução das taxas de vacinação contra brucelose bovina segundo as áreas de risco para febre aftosa no estado do Pará; Seroepidemiological survey for canine leptospirosis in the coast of São Paulo State, Brazil e Long bone fractures in cats: a retrospective study.

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

MANEJO ALIMENTAR DE CAPRINOS E OVINOS NOS TRÓPICOS

Marcos Cláudio Pinheiro Rogério^{1*}
Alexandre Ribeiro Araújo²
Roberto Cláudio Fernandes Franco Pompeu¹
André Guimarães Maciel e Silva³
Eziquiel de Moraes³
Humberto de Queiroz Memória⁴
Delano de Sousa Oliveira⁵

RESUMO

A adequada alimentação de pequenos ruminantes passa por alguns aspectos importantes, notadamente no que diz respeito à compreensão do comportamento alimentar destes animais, o planejamento alimentar, a opção por dietas de custo mínimo, as práticas de conservação de volumosos e de manejo de pastos nativos e cultivados, a produção forrageira adequada por área e a possibilidade de substituir os alimentos tradicionais por alimentos alternativos, tais como os subprodutos agroindustriais. Nesse sentido, é preciso vincular a alimentação dos rebanhos em função das categorias produtivas e visando a suplementação estratégica em determinados períodos do ano, quando a escassez de forragens é mais frequente e para as categorias mais exigentes. A adaptação dos sistemas produtivos à realidade de cada região brasileira contribui para o fortalecimento da produção de pequenos ruminantes e para o estabelecimento de sistemas de arraçãoamento mais adequados, bem planejados e que evitem situações desfavoráveis, como a subnutrição e a queda de parâmetros produtivos.

Palavras-chave: nutrição, planejamento alimentar, pequenos ruminantes.

DIETARY MANAGEMENT OF SHEEP AND GOATS IN THE TROPICS

ABSTRACT

The adequate supply of small ruminants undergoes some important aspects, especially with regard to understanding the feeding behavior of these animals, the food planning, the choice of minimum cost diets, conservation practices and management of forage pastures and native grown, forage production appropriate for the area and the possibility of replacing traditional foods for alternative foods, such as agroindustrial byproducts. In this sense, it is necessary to link the feeding of livestock production according to the categories and targeting strategic supplementation in certain periods of the year when the shortage of fodder is more common and more demanding classes. Adaptation of production systems to the reality of each region contributes to the strengthening of small livestock production and to establish systems of feeding more appropriate, well designed and to avoid unfavorable situations, such as malnutrition and falling production parameters.

Keywords: food planning, nutrition, small ruminants.

MANEJO DE LA DIETA DE OVEJAS Y CABRAS EN EL TRÓPICO

¹ Embrapa Caprinos e Ovinos. Estrada Sobral-Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, Sobral, Ceará, Brasil, 62010-970.

*Correspondência: Telefone: +55 88 3112-7555, marcos.claudio@embrapa.br.

² Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. Campus Pampulha, Santo Antonio, Belo Horizonte, MG, Brasil, 30.123-970, xandyzoo@hotmail.com.

³ Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará, Pirapora, Castanhal, PA, Brasil, andregms@ufpa.br.

⁴ Fazenda Lagoa Seca, Alto dos Onórios, Cariré, Ceará, Brasil, 62.000-000, humbertozootecnista@gmail.com.

⁵ Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil, 64049-550, delanozootecnia@gmail.com.

RESUMEN

El suministro adecuado de los pequeños rumiantes sufre algunos aspectos importantes, sobre todo en lo que respecta a la comprensión del comportamiento de alimentación de estos animales, la planificación de los alimentos, la elección de la dieta de costo mínimo, las prácticas de conservación y manejo de pastos forrajeros y nativos crecido, producción de forraje adecuado para la zona y la posibilidad de sustituir los alimentos tradicionales de alimentos alternativos, como subproductos agroindustriales. En este sentido, es necesario vincular la alimentación de la ganadería de acuerdo con las categorías y la orientación suplementación estratégica en determinadas épocas del año, cuando la escasez de forraje es más común y las clases más exigentes. Adaptación de los sistemas de producción a la realidad de cada región contribuye al fortalecimiento de la producción de ganado menor y establecer sistemas de alimentación más adecuado, bien diseñado y evitar situaciones desfavorables, como la desnutrición y la caída de los parámetros de producción.

Palabras clave: nutrición, planificación alimentar, pequeños rumiantes.

1. INTRODUÇÃO

A espécie ovina possui hábitos alimentares de pastejo baixo, com predileção a gramíneas e leguminosas, em ambientes com menor disponibilidade dessa vegetação, alimentam-se também de arbustos e ervas. Já os caprinos, tem por hábito o pastoreio com a cabeça ereta, consumindo prioritariamente folhas de árvores e arbustos, tendo preferência também por dicotiledôneas herbáceas. Devido a essa versatilidade, classificou-os como selecionadores intermediários por possuírem ampla plasticidade alimentar, comportamento classificado como oportunístico, na medida em que modificam facilmente suas preferências alimentares em função da época do ano, disponibilidade e qualidade da forragem (1).

No Brasil, os sistemas de criação de ovinos e caprinos têm se expandido para além das fronteiras das regiões nordeste e sul, tradicionalmente produtoras, com importantes incrementos quantitativos principalmente nos rebanhos das regiões sudeste e centro-oeste brasileiras. De acordo com Resende et al. (2), não somente o efetivo tem aumentado, mas a capacidade produtiva dessas espécies também tem evoluído devido a vários fatores, destacando-se o melhoramento genético, nutricional e sanitário. Os autores também destacaram que a ovinocaprinocultura atualmente tem aumentado sua participação no agronegócio brasileiro e, dessa forma, destacaram que para acompanhar essa expansão houve também aumento nas pesquisas científicas na área.

O Nordeste Brasileiro possui o maior rebanho de ovinos e caprinos brasileiros. Em regiões semiáridas, de acordo com Ben Salem (3), os ovinocaprinocultores praticam a atividade em escala limitada devido à escassez e à má distribuição pluvial e baixa utilização de ferramentas de manejo animal. Ainda de acordo com esse autor, a situação é agravada pela degradação dos pastos nativos, contínua elevação dos preços dos alimentos concentrados e instabilidade econômica internacional que também cria sérias dificuldades para o provisionamento de nutrientes. Bomfim et al. (4) adicionaram que o baixo nível de adoção de tecnologias aplicadas está em fatores não tecnológicos como o baixo preço de comercialização dos produtos, que desestimula o investimento na propriedade; a falta de crédito ou o alto custo dele; a falta de uma política de assistência técnica, dentre outros. Estes fatores, isolados ou em conjunto, anulam qualquer tentativa de emplacar novas tecnologias para melhorar o desempenho dos sistemas.

A região sudeste tem recebido constantes incrementos quantitativos em seus rebanhos particularmente pelo desenvolvimento da caprinocultura leiteira e ovinocultura de corte. A

região sul tem avançado na criação de caprinos e, muito embora, tenha havido, nos últimos anos, decréscimo no rebanho ovino, ainda é a segunda região com maior efetivo (5). A região centro-oeste tem crescido em termos de rebanhos de pequenos ruminantes, tendo em vista o objetivo de comercialização em grande escala da carne ovina e caprina para o atendimento dos mercados interno e externo. A região norte, embora com crescimento mais modesto, também avança nas criações de pequenos ruminantes. Cada região, com realidades tão díspares, merece a atenção da pesquisa em sistemas de alimentação, especialmente considerando-se a inter e a transdisciplinaridade das áreas de atuação dos pesquisadores nesse tema.

Na maioria dos criatórios de pequenos ruminantes brasileiros, o modelo extensivo é o predominante. O pasto nativo e/ou cultivado é a base alimentar para os rebanhos. Quando os pastos tornam-se escassos e/ou reduzem sua qualidade nutritiva, a suplementação com forrageiras de corte e ração concentrada são estratégias recomendadas. No sistema intensivo à pasto, gramíneas são cultivadas e os animais são mantidos em piquetes, com acesso a água e sal mineral à vontade. Dependendo do manejo, da disponibilidade de forragem e da categoria animal produtiva, em determinados períodos do ano, o fornecimento de suplementação alimentar ou mineral pode ser feita. A conservação de forrageiras na forma de feno e/ou silagem, a cana-de-açúcar e capins de corte (ex. capim elefante cv. Napier) são alguns exemplos de suplementos volumosos oferecidos nos períodos de escassez de pasto e/ou quando a sua qualidade nutritiva reduz. A ração concentrada contribui com o suprimento de nutrientes não fornecidos pelos volumosos e que são necessários aos animais.

Em se tratando de exigências nutricionais de pequenos ruminantes, vários são os sistemas que predizem as exigências nutricionais das diversas categorias de produção de ovinos (6-9). Mesmo com todas essas opções, tem sido constatado pelos pesquisadores no Brasil que como são sistemas modelados para animais, alimentos e ambientes distintos dos nossos, é possível que os modelos definidos não estejam consoantes às nossas condições. Esforços estão sendo feitos entre os centros de pesquisa e universidades nacionais para o desenvolvimento das tabelas de exigências nutricionais de caprinos e ovinos nacionais, porém, para a consolidação desse projeto, são necessários mais trabalhos e mais efetividade na compilação dos resultados já obtidos.

Objetivou-se, com a presente revisão, abordar alguns aspectos importantes acerca do manejo alimentar de caprinos e ovinos nos trópicos, em suas diferentes categorias produtivas, os alimentos comumente utilizados em sua alimentação e possíveis alternativas alimentares, além da importância do planejamento alimentar, métodos de estocagem e conservação de forragens e perspectivas de pesquisas em avaliação de alimentos para caprinos e ovinos.

2. CARACTERIZAÇÃO DOS ALIMENTOS NOS TRÓPICOS

Para aprimorar os sistemas de produção de caprinos e ovinos nos trópicos é necessário particularizar as especificidades de cada região produtora considerando-se os alimentos disponíveis, a constância na oferta e os custos de produção e aquisição de cada um deles, sejam volumosos, concentrados tradicionais ou mesmo subprodutos da agroindústria. Além do fator disponibilidade, o valor bromatológico dos alimentos é primordial ao ajuste dietético, proporcionando estabelecer as melhores estratégias de suplementação alimentar que sejam economicamente viáveis, considerando o máximo desempenho animal (10).

No tocante às espécies forrageiras, para que seja possível explorar o potencial de produção e crescimento de uma determinada espécie forrageira é necessário conhecer a estrutura básica da planta e a maneira segundo a qual seus órgãos funcionais e seu metabolismo são afetados pelo estresse comum a um ambiente tropical. Um dos principais fatores a ser observado neste caso é a digestibilidade das forrageiras. A digestibilidade de uma forrageira está relacionada com os diferentes tipos de tecidos e seus órgãos e com a idade da

planta, permitindo diferenciação nutricional de espécies e cultivares. Assim, a presença de tecidos vegetais lignificados está relacionada com menores taxas de digestibilidade. Isso ocorre porque as plantas tropicais apresentam um tipo de rota metabólica para a fixação do carbono na estrutura vegetal que ocorre dentro do mesófilo e da bainha vascular. Isso lhes confere maior densidade de feixes vasculares, sendo essa estrutura circundada por células da bainha parenquimática, o que implica em estrutura mais espessa e conseqüente elevado teor de carboidratos estruturais (11).

A temperatura ambiente também interfere na digestibilidade das plantas tropicais, reduzindo entre 0,08 a 1,81 unidades percentuais para cada grau centígrado de elevação de temperatura. Valores mais altos de digestibilidade são mais evidenciados em estações frias do que em quentes. A anatomia da folha, por sua vez, não apenas influencia a produção de forragem como também seu valor nutritivo e o desempenho animal. Em forrageiras tropicais, células do mesófilo e do floema são rapidamente digeridas, as da epiderme e da bainha parenquimática dos feixes são digeridas mais lentamente, células do xilema e esclerênquima, por serem mais espessas e lignificadas, não são digeridas (11).

O pastejo direto em pastos nativos normalmente implica em alta variação de características bromatológicas e de digestibilidade. Quando o pastejo é feito em pastos cultivados, geralmente em condições de pastejo rotacionado, o processo requer cuidado em termos de taxas de lotação, períodos de descanso, turno de rega e reposição de nutrientes ao solo. Para isso, faz-se necessário uma continuidade do estudo do hábito de pastejo animal em associação com o hábito de crescimento das plantas forrageiras consumidas sob essas condições. O uso de forrageiras para corte (manejadas intensivamente) para fornecimento direto no cocho ou para fenação e ensilamento podem permitir a manutenção do valor nutritivo das forrageiras cultivadas ao longo do ano, desde que respeitados os aspectos relativos à nutrição das plantas, características fisiológicas específicas das plantas forrageiras e fornecimento hídrico adequado.

Em se tratando de região tropical, ao mesmo tempo em que se compreende que o Brasil é um verdadeiro celeiro na produção de alimentos concentrados, verifica-se também a relevante oscilação nos preços de mercado normalmente determinados pela lei da oferta e procura em períodos de entressafra. Nesse caso, os estoques reguladores do governo que poderiam suportar essa oscilação, apresentam-se insuficientes em área disponível para o armazenamento. Estes aspectos, em determinados períodos do ano, em associação principalmente com a escassez de forragens nos períodos de estiagem, a falta de planejamento alimentar e o ineficiente sistema de escoamento da produção das regiões produtoras de grãos para as regiões consumidoras terminam por elevar os preços, implicando muitas vezes em inviabilidade econômica dos sistemas produtivos. Sob esse aspecto, a utilização de subprodutos agroindustriais pode ser alternativa tendo em vista a ampla disponibilidade específica em cada região, cujas pesquisas têm demonstrado o potencial de uso como substitutos de volumosos e de concentrados proteicos e energéticos.

Avaliando o desempenho de cordeiros recebendo resíduo de biodiesel do dendê (12), observaram efeito crescente no consumo de matéria seca, aumento no ganho de peso, melhora nas características e acabamento de carcaça, sugerindo que a inclusão em até 5% da matéria seca total dietética é alternativa viável para o incremento energético na dieta de ovinos em crescimento. Por sua vez, avaliando a substituição do capim mombaça pela torta de murumuru (*Astrocaryum murumuru* var. *murumuru* Mart.), nas concentrações de 0; 10; 20; 40; e 60% sobre o consumo e digestibilidade aparente de nutrientes, além do balanço nitrogenado dietético, concluiu que a utilização da torta de murumuru interfere no consumo impossibilitando sua utilização como concentrado exclusivo e que deve ser usado com alternativa alimentar em até 20% da dieta para ovinos (13). E substituiu a alimentação de ovinos a base de capim mombaça pela torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em 0%, 10%, 20%, 40% e 60%, avaliando o consumo voluntário, digestibilidade aparente dos

nutrientes e balanço de nitrogênio, não observou influência negativa sobre o consumo da maioria dos nutrientes, com exceção dos consumos de extrato etéreo e proteína bruta que foram prejudicados nos níveis mais elevados de inclusão, pela redução da digestibilidade dietética (14).

A seguir são apresentados os dados de composição bromatológica das tortas de cupuaçu e de murumuru (Tabela 1) (15).

Tabela 1. Composição bromatológica das tortas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e murumuru (*Atrocaryum murumuru*).

| Nutriente (%) | Torta de Cupuaçu | Torta de Murumuru |
|-----------------|------------------|-------------------|
| Matéria Seca | 91,67 | 90,94 |
| Proteína Bruta | 12,89 | 9,34 |
| Extrato Etéreo | 10,78 | 13,29 |
| Resíduo Mineral | 8,56 | 0,92 |
| FDN* | 24,17 | 56,95 |
| FDA** | 19,81 | 49,61 |
| Lignina | 7,91 | 8,59 |
| PIDN*** | 10,29 | 7,43 |

*FDN=Fibra em Detergente Neutro; **FDA=Fibra em Detergente Ácido; ***PIDN=Proteína Insolúvel em Detergente Neutro.

A torta de babaçu pode sofrer alterações em sua composição dependendo da forma como o óleo é extraído (10). Os animais que recebem dietas contendo esse alimento devem passar por adaptação (16). Após isso, recomendaram entre 15 a 30% de inclusão em dietas para ovinos. Várias são as possibilidades quando tratamos de alimentos alternativos. Vale, todavia, a regra da disponibilidade regional, constância na oferta e avaliação da qualidade bromatológica.

3. PLANEJAMENTO ALIMENTAR

O planejamento alimentar é uma estratégia que leva ao estabelecimento de um conjunto coordenado de ações que permitam produzir e estocar alimentos em quantidade suficiente para o adequado suprimento de nutrientes aos animais em determinado período, oportunizando os melhores preços de aquisição (17). Outro aspecto relativo ao planejamento é o de se evitar a escassez alimentar nos períodos mais críticos de oferta de forragens. Nas duas situações o planejamento alimentar é a base para a compra e estocagem de alimentos quando o custo de aquisição é menor (período de safra) para o caso principalmente de alimentos concentrados e em condições de armazenamento do excedente forrageiro na forma de silagem ou feno ou mesmo a formação de bancos de proteína, estratégicos para a suplementação volumosa rica em proteína.

O sucesso do planejamento alimentar depende dos seguintes aspectos:

1. Conhecimento sobre as exigências nutricionais dos animais e de consumo de matéria seca de ovinos e caprinos nas diferentes categorias de produção;
2. Conhecimento sobre o valor nutricional dos alimentos utilizados;
3. Quantidade de forragens e outros alimentos disponíveis na fazenda;
4. Existência de alimentos alternativos de boa qualidade nutricional na região;
5. Preço de alimentos a serem comprados mais acessíveis e possibilidade de estocagem;
6. Realização de práticas de fenação e silagem para conservação de forragens;
7. Conhecimento sobre práticas de suplementação alimentar e de sistemas de pastejo intensivos;
8. Acompanhamento técnico para a previsão de compra e produção de alimentos conforme o tempo necessário para se alimentar um determinado grupo de animais de

acordo com a categoria de produção e exigências nutricionais, bem como obedecendo ao preparo de rações de mínimo custo.

Sob esse último aspecto, o planejamento alimentar considera o efetivo de animais que serão alimentados ao longo do ano, o consumo médio por cabeça/dia, o número de dias em alimentação, a disponibilidade e a capacidade para estocagem dos alimentos, além do percentual relativo a perdas e sobras que devem ser incorporados (em torno de 20-30% do total calculado).

Logo abaixo (Tabela 2), é apresentado um exemplo de previsão para um adequado planejamento alimentar, considerando-se a necessidade de forragem para um rebanho de 100, 200 ou 300 cabras com peso vivo médio de 40 kg para um período de oito meses e consumo médio, por animal, de 3,0% do peso vivo em matéria seca ($40 \times 0,03 = 1,2$ kg MS).

Tabela 2. Simulações de consumo médio de matéria seca (MS) e reserva necessária de forragem para o período de estiagem.

| Número de animais | Consumo médio kg MS/dia | Consumo médio do rebanho kg MS/dia | Reserva necessária para período seco t MS |
|-------------------|-------------------------|------------------------------------|---|
| 100 | 1,200 | $100 \times 1,200 = 120$ | $120 \times 240 = 28,8$ |
| 200 | 1,200 | $200 \times 1,200 = 240$ | $240 \times 240 = 57,6$ |
| 300 | 1,200 | $300 \times 1,200 = 360$ | $360 \times 240 = 86,4$ |

Para atender a necessidade do rebanho de 200 animais com a oferta de volumosos, nesse caso, a reserva poderia ser formada com 67,8 t de feno (85% MS) ou 192 t de silagem (30% MS) ou 288 t de capim verde (20% MS). Os valores dão conta da expressiva quantidade necessária ao rebanho e da necessidade real de se planejar o fornecimento alimentar, especialmente nos períodos mais críticos do ano de escassez de forragens.

Conservar a forragem que será fornecida, além de garantir a oferta para um determinado período, pode também garantir a qualidade e a uniformidade do valor nutritivo forrageiro. O ensilamento, preservação da forragem verde em ambiente anaeróbico, é prática relativamente simples e acessível para os criadores. Qualquer forrageira aceitável pelos caprinos e ovinos, na forma verde, normalmente se presta para o ensilamento, desde que colhida quando apresentar a melhor qualidade nutritiva. O milho, o sorgo e o capim-elefante são as forrageiras mais utilizadas. O processo de fenação, por sua vez, vem sendo utilizado para o aproveitamento do excedente forrageiro produzido (18). O armazenamento do feno é muito flexível, porque pode ser feito em fenis, medas ou depósitos (enfardados). A distribuição é simples, pois pode ser feita no cocho, podendo também ser consumido diretamente quando produzido em medas.

Em se tratando de trópico semiárido, as secas e incertezas climáticas recorrentes constituem fatores limitantes à produção animal. Devido às suas características morfofisiológicas, as cactáceas representam fonte de água e alternativa alimentar para as regiões sub-úmida e semiárida, podendo também constituir reserva alimentar e meio para se realizar um adequado planejamento alimentar forrageiro para os períodos mais críticos do ano. A palma constitui alimento volumoso suculento de grande importância para os rebanhos, notadamente nos períodos de secas prolongadas, pois, além de fornecer alimento verde, contribui no atendimento de grande parte das necessidades de água dos animais. As espécies de palmas forrageiras mais utilizadas na alimentação animal no Nordeste são *Opuntia ficus* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck (19).

Pelo lado econômico, sempre foi objeto da consideração dos nutricionistas a obtenção de um método que fornecesse a mistura mais barata e que atenda aos requisitos dos animais, para uma dada situação (*ração de mínimo custo*). Atualmente os programas de computação

utilizados para a formulação de rações facilitaram bastante este tipo de balanceamento de dietas para pequenos ruminantes e são amplamente utilizados pelos nutricionistas (17).

Adaptando o cálculo realizado para valores de 2013 relativos ao comércio de Sobral-Ceará, levemos em consideração o preparo de um suplemento concentrado proteico-energético para um lote de 100 cordeiros em terminação com seis meses de idade, peso vivo médio de 30 kg e ganho de peso esperado de 200 g/dia. Esses animais sendo mantidos em confinamento recebendo, como fonte volumosa, capim elefante (*Pennisetum purpureum*) com 56 dias de idade de corte, à vontade (17).

O suplemento, composto de farelo de soja, milho, farelo de trigo e calcário, para correção do provável desbalanço de cálcio e fósforo dietético resultante da inclusão do farelo de trigo na ração. A seguir estão apresentados os preços dos alimentos (Tabela 3).

Tabela 3. Preços dos alimentos utilizados para o cálculo do suplemento em dois diferentes meses do ano de 2013*.

| Alimentos | Preços | | | |
|-----------------|--------------|------------|------------|-------------|
| | Janeiro/2013 | Abril/2013 | Julho/2013 | Agosto/2013 |
| Farelo de Soja | R\$ 1,50 | R\$ 1,34 | R\$ 1,30 | R\$ 1,34 |
| Farelo de Trigo | R\$ 1,00 | R\$ 0,37 | R\$ 0,50 | R\$ 0,50 |
| Milho | R\$ 0,88 | R\$ 0,68 | R\$ 0,70 | R\$ 0,66 |
| Calcário | R\$ 0,30 | R\$ 0,30 | R\$ 0,30 | R\$ 0,30 |

*Adaptação de tabela utilizando informações do comércio de Sobral-Ceará (17).

Segue logo abaixo (Tabela 4), a composição químico-bromatológica do capim elefante fornecido, dos alimentos utilizados para a composição do suplemento e a composição do próprio suplemento formulado.

Tabela 4. Composição química (%) do capim elefante utilizado, dos alimentos concentrados e do suplemento formado por eles em base de matéria seca.

| Componentes | Capim elefante | Farelo de Soja | Farelo de Trigo | Milho | Calcário | Suplemento Formulado |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|-------|----------|----------------------|
| Matéria Seca | 25,50 | 86,89 | 87,47 | 92,58 | 100,0 | 88,90 |
| Proteína Bruta | 10,85 | 44,68 | 11,80 | 9,15 | - | 15,34 |
| NDT | 57,57 | 75,48 | 76,00 | 85,00 | - | 74,40 |
| FDN | 74,63 | 14,00 | 47,01 | 9,00 | - | 33,11 |
| Cálcio | 0,59 | 0,33 | 0,15 | 0,03 | 34,00 | 1,61 |
| Fósforo | 0,41 | 0,48 | 0,99 | 0,26 | - | 0,74 |

Fonte: (17)

O suplemento conteria em matéria natural as seguintes proporções:

Farelo de soja → 14,16%

Farelo de trigo → 63,59%

Milho → 18,44%

Calcário → 3,81%

Para cordeiros em terminação estima-se um consumo de suplemento em torno de 300g/cordeiro/dia. O custo do suplemento formulado seria de R\$ 1,02/kg (preços de Janeiro/2013), R\$ 0,56/kg (preços de Abril/2013), R\$ 0,64/kg (preços de Julho e Agosto/2013). Para 60 dias de confinamento, para os 100 cordeiros consumindo cada um deles 300g/dia, teríamos um custo com suplemento de R\$ 1.839,00 com alimentos comprados em Janeiro/2013 e de R\$ 1.011,33 se os alimentos tivessem sido comprados em Abril/2013. Uma economia para a compra dos alimentos em Abril de R\$ 827,67. Os cálculos revelam,

portanto, a importância do planejamento alimentar para o preparo de rações de mínimo custo e para a maior economicidade do sistema de produção.

Vale ressaltar que o menor preço por quilo do alimento utilizado também deve considerar as condições de infraestrutura adequada para o armazenamento. Armazenagem inadequada pode resultar em perda de valor nutritivo e perdas quantitativas. O ataque de pragas e roedores e o crescimento de fungos provocam problemas, tanto pelo seu próprio desenvolvimento, quanto pelas micotoxinas produzidas (17).

4. MANEJO ALIMENTAR E CATEGORIAS PRODUTIVAS

4.1. Manejo das crias

Nas primeiras semanas de vida, é importante a administração do colostro, rico em células de defesa (imunoglobulinas) que contribuirão com a prevenção de doenças. Em casos onde a fêmea não apresente ou tenha produção insuficiente de colostro, se a cria não for aceita pela mãe, o neonato poderá ser colocado junto à outra fêmea recém-parida. Pode também ser realizado o aleitamento artificial em mamadeira, preferencialmente nas primeiras 3 horas de vida (20). Se o colostro estiver congelado, deverá ser descongelado em banho-maria. Os cuidados com a higiene dos materiais utilizados são fundamentais para evitar o risco de diarreias nos animais durante essa fase.

A partir dos 10 dias de idade, cordeiros e cabritos já começam a ingerir alimentos sólidos. Para antecipar o desenvolvimento quanti-qualitativo do rúmen, a prática do *creep feeding* é alternativa interessante nesta fase. Além da contribuição com o desenvolvimento papilar, o *creep feeding* contribui com o incremento nutricional na dieta das crias (leite), aumentando a taxa de crescimento, melhorando a eficiência alimentar e evitando o desgaste excessivo das fêmeas através da amamentação (21). Segundo Neiva et al. (22), com o menor desgaste das fêmeas, é proporcionada melhoria da eficiência reprodutiva, uma vez que a cria está substituindo parcialmente o leite pelo alimento fornecido.

O consumo de alimento pelos cordeiros com duas a seis semanas de idade está ligado à palatabilidade, forma física da ração e das condições do ambiente onde o manejo será adotado (22). Os mesmos autores ressaltaram que o concentrado deve ter proteína com alta digestibilidade, energia prontamente disponível, minerais com alta disponibilidade biológica, bem como vitaminas. Com esse adensamento nutritivo, o *creep feeding* torna-se indispensável para encurtar o tempo de acabamento dos animais para abate (23). O fornecimento de volumosos de alta qualidade também é recomendado, pois contribui para o desenvolvimento da capacidade de ingestão de alimentos.

Geralmente o leite e o pasto oferecido aos cordeiros não atendem o exigido. Como a curva de crescimento desses animais está em franca ascendência, para reduzir o tempo de abate, a incorporação de dietas concentradas pode potencializar o desenvolvimento. Ao avaliar um nível de energia que fosse ideal para esta fase, incorporou-se à dieta de cordeiros Suffolk, três níveis de energia (2,6; 2,8 e 3,0 Mcal de energia metabolizável/ kg MS) em sistema de *creep feeding*. Observou-se que a dieta com 3,0 Mcal proporcionou o melhor desempenho para esses animais ($P < 0,05$) com ganhos médios de 408,57g/dia (24). Para determinar o teor ideal de proteína bruta em dietas para cordeiros Suffolk, Ortiz et al. (25) utilizaram 15, 20 e 25% de PB na dieta dos cordeiros e verificaram que dietas com 25% de PB favoreceram a maiores ganhos (410g/dia) ($P < 0,05$) sem alterar as características da carcaça.

Uma das formas para incrementar o desempenho das crias a pasto é o *creep grazing*. Essa estratégia consiste em permitir para os cordeiros acesso restrito a um pasto de melhor qualidade, sem que eles percam o contato visual da mãe. Esse sistema permite ganhos de peso mais moderados, mas em sistemas de produção a pasto é interessante uma vez que para atingir o tempo de abate em comparação ao confinamento não é tão distante (26).

4.2. Manejo de fêmeas de recria

O manejo nutricional adequado das fêmeas na fase de recria é crítico, pois influencia diretamente na idade à puberdade e à primeira cobertura (20). Recomenda-se que 70% do peso da fêmea adulta seja atingido aos 7 meses de idade e, como critério para a primeira monta, o uso do peso corporal como parâmetro é mais coerente que a idade da fêmea. O fornecimento de volumosos de boa qualidade e concentrado torna possível a adoção desse manejo, tendo como benefícios, a redução da idade ao primeiro parto.

A subnutrição em fêmeas desta fase pode resultar em retardo no desenvolvimento reprodutivo, aumentando o tempo necessário para reposição no plantel de matrizes. A presença de animais jovens no plantel recebendo um manejo alimentar pobre ou insuficiente em nutrientes tende a aumentar as perdas embrionárias (27).

Durante a puberdade, alta oferta de concentrados também não é aconselhável. O ganho de peso excessivo pode acarretar em maior deposição de gordura nas glândulas mamárias e redução na futura produção de leite (20).

O efeito da subnutrição ocorrida no início da gestação pode ser deletério à gestação, especialmente a fêmeas jovens que, naturalmente, já apresentam exigências nutricionais maiores pelo desenvolvimento uterino, de glândulas mamárias e anexos embrionários (8). Segundo Borges et al. (27) a recuperação não chega a ser total quando ovelhas que ainda não atingiram o peso adulto sofreram restrição alimentar no início da gestação em relação ao terço final de gestação. A proporção de concentrados à dieta deve ser aumentada gradativamente, ao ponto que, antes do parto, o consumo de concentrado em matéria seca seja equivalente a pelo menos 1% do peso vivo. O aumento do nível de concentrado nas dietas aumenta a oferta de glicose para o desenvolvimento fetal, limitando a mobilização da gordura corporal e problemas metabólicos associados, como toxemia da gestação ou cetose (28). É importante que as borregas ao parto estejam com escore de condição corporal entre 3,0 e 3,5 (29). Para o incremento dos índices reprodutivos e produtivos do rebanho, a avaliação do ECC das fêmeas é uma prática necessária na rotina de qualquer propriedade (28).

4.3. Manejo de fêmeas

Dietas com maior teor nutritivo, notadamente em energia, são oferecidas às fêmeas ao longo de duas a três semanas que antecedem a estação de monta e nas duas semanas posteriores. Esse manejo é conhecido por *flushing*. Como vantagens, alta apresentação de cios no momento da entrada dos reprodutores, aumento da taxa ovulatória, maior concepção e sobrevivência embrionária, com maiores taxas de fertilidade e prolificidade. Adicionalmente, o adensamento de nutrientes dietéticos pode também contribuir para a correção do *status* nutricional dos animais antes de entrar na estação de monta. Fêmeas com escore corporal adequado dispensam tal manejo, uma vez que trabalhos relatam que a superalimentação durante a fase inicial da gestação pode causar efeitos negativos sobre a viabilidade embrionária.

De acordo com Rogério et al. (28), é desejável que na fase reprodutiva, os animais estejam com ECC entre 3 e 4; durante o início e meio da gestação, o ECC deve estar entre 2,5 e 4; no terço final da gestação deve estar entre 3,0 a 3,5; e 3,5 a 4,0 para gestantes com 1 e 2 fetos, respectivamente. Após o parto e no início da lactação, o ECC deve ser de no mínimo 2,0. É importante ressaltar que fêmeas em início de gestação não devem perder mais do que 7% do seu peso, pois conforme estes autores, esta redução acarreta em mudanças de 0,5 na condição corporal dos animais. A seguir (Figura 1), é possível observar o escore de condição corporal em função da fase do ciclo produtivo.

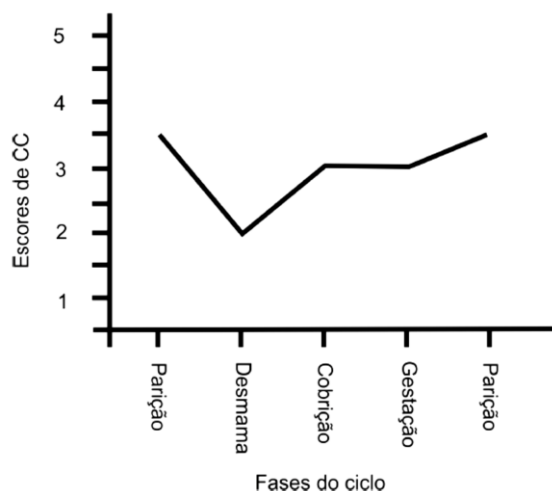


Figura 1. Escore de condição corporal em função da fase do ciclo reprodutivo-produtivo. Fonte: Cezar e Sousa (21).

Pimenta Filho et al. (30) avaliaram o desenvolvimento de cordeiros Morada Nova a partir do fornecimento às mães de diferentes níveis de energia metabolizável dietéticos (2,2; 2,8 e 3,4 Mcal/dia) no terço final de gestação. De acordo com o estudo, o efeito nível energético dietético não influenciou o peso dos cordeiros ao nascimento e até às quatro primeiras semanas de vida, nem a composição do colostro das matrizes ($P>0,05$), mas os autores ressaltaram um possível direcionamento dos nutrientes dietéticos para os tecidos fetais e mamários, visto que a mobilização de reservas não foi observada nesse estudo.

Na fase inicial da gestação, as exigências nutricionais das ovelhas devem ser calculadas para exceder ligeiramente a manutenção (29,31). Geralmente, a utilização de uma dieta à base de forrageiras de boa qualidade é suficiente para atender as exigências nesse período. Nesta fase, o crescimento fetal equivale a 10-15% do peso do cordeiro. Devido este fato, maior atenção é dada às fêmeas no terço final de gestação (31).

Nas últimas semanas de gestação, as ovelhas exigem maior aporte de nutrientes em menor volume de alimentos por conta da redução do espaço abdominal para o rúmen. Ajustes na dieta devem ser realizados, especialmente com a inclusão de alimentos de maior densidade energética (28). Animais mal nutridos durante a gestação apresentam maior tempo de recuperação pós-parto, maiores intervalos entre partos, menor número de partos duplos, dentre outros problemas (32). Situações em que fêmeas ao final da gestação sofreram restrição severa e abrupta resultam em decréscimo da taxa de crescimento fetal em até 40%. Se a restrição prosseguir por mais de duas semanas nesta fase, as perdas podem ser ainda maiores.

A viabilidade e o desenvolvimento pós-natal das crias são diretamente influenciados pelo aporte energético dado às matrizes no periparto (30). Os mesmos autores destacaram que uma ovelha subnutrida no último terço da prenhez terá cordeiros com menor peso ao nascimento, mesmo que o plano nutricional durante os primeiros 100 dias de gestação tenham sido adequados. Inversamente, um alto nível nutricional no último terço da gestação produzirá cordeiros normais, ainda que a nutrição no início da gestação tenha sido deficitária. Isso, entretanto, não quer dizer que sejam negligenciadas as fases anteriores ao periparto, em termos de manejo nutricional adequado (31).

As exigências das fêmeas no início da lactação correspondem ao dobro da referente ao final da gestação (31). As exigências nutricionais das ovelhas em lactação variam ao longo das fases do ciclo produtivo. Os sistemas de produção podem adotar intervalos de Partos (IP) de 8 a 12 meses. Para que o sistema funcione bem com intervalos mais curtos, as fêmeas devem ter alimentação de alta qualidade durante todo o ano, uma vez que serão bem mais exigidas. Além de oferecer volumosos de boa qualidade, cerca de 500 g/dia de concentrado,

mais 200 a 300 g/dia por kg de leite produzido, de acordo com a fase de lactação deverão ser oferecidos (20).

Para amenizar a perda de peso é aconselhável utilizar rações palatáveis e com elevada densidade energética, sem esquecer o fornecimento da quantidade mínima de fibra. De acordo com Macedo Júnior et al. (32), pelo menos 28,08% de FDN deve ser incorporado nas dietas de fêmeas ovinas no final da gestação. É importante ressaltar que nos sistemas de produção de leite as fêmeas devem ter a lactação interrompida entre 45 a 60 dias antes do parto, para se recuperarem, produzam colostro e venham a parir em condição corporal adequada para uma nova lactação.

De modo geral, para todas as categorias produtivas é desejável que o fornecimento de água de boa qualidade seja feito e também o fornecimento de suplementos minerais específicos para cada categoria produtiva.

5. SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE OVINOS E CAPRINOS NOS TRÓPICOS

5.1. Produção de pequenos ruminantes a pasto

Para estabelecer um sistema a pasto é importante conhecer os hábitos dos pequenos ruminantes sob esta condição. São hábitos como ramoneio e considerável versatilidade, no caso dos caprinos. Os caprinos são consumidores seletivos, mas são inferiores aos bovinos e ovinos quanto à digestão da fibra, a despeito de sua fama de ser capaz de digerir qualquer coisa. Os ovinos, por sua vez, geralmente consomem a pasto com cabeça abaixada, alimentando-se preferencialmente de gramíneas. A associação entre estas duas espécies no consumo a pasto pode inclusive potencializar o aproveitamento do consumo forrageiro e a redução de infestações parasitárias (1). A preferência do animal por determinadas porções da planta está diretamente relacionada com sua intensidade de pastejo. A seletividade pode ser exercida entre espécies de plantas, na parte da planta (assim, folhas novas, inflorescências e frutos constituem as partes mais preferidas em comparação com caules, folhas secas, ramos, etc.), no seu local de ocorrência e na época do ano (33). O hábito alimentar dos ovinos consiste em pastear com maior intensidade pela manhã até as 11 horas e à tarde das 15 horas até o anoitecer. A ruminação ocorre principalmente no período noturno e final da tarde e o descanso maior à noite.

Com esses entraves pertinentes é necessário desenvolver estratégias para intensificar a produção forrageira e assim, minimizar os efeitos da sazonalidade da produção de forragem, sempre lembrando as características edafoclimáticas da região que devem ser levadas em consideração para a implementação do sistema (34). O mesmo autor ressaltou que o elevado custo para construção e manutenção das cercas divisórias, principalmente para ovinos e caprinos, contribuirão para a elevação dos custos de produção.

Para escolher a espécie forrageira, é prudente ter conhecimento quanto a sua adaptação ao clima e solo da região, observar o manejo e o melhor aproveitamento forrageiro. Os capins *Andropogon* (*Andropogon gayanus*), Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), as braquiárias, o Capim Buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), o Coastcross (*Cynodon dactylon* cv. Coastcross), o Capim Estrela Africana (*Cynodon nlemfuensis* cv. nlemfuensis), o Capim Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) e o Capim Quicuío (*Pennisetum clandestinum*) são alguns exemplos de plantas forrageiras que podem ser exploradas para o pastejo de ovinos e caprinos nos trópicos. O Capim Gramão (*Cynodon spp.*) e o Capim Tanzânia (*Panicum maximum* cv. *tanzania*) já foram bem estudados pela EMBRAPA-Caprinos e Ovinos. De acordo com Neiva (34), algumas espécies estão sendo usadas com cautela, como é o caso da *Brachiaria decumbens* após casos de fotossensibilização, o que pode indicar o uso em pastejo noturno, caso haja essa possibilidade.

Para proceder com o plantio, analisar o solo para que se conheça a fertilidade adequada, operações de limpeza, aração e gradagem com o objetivo de deixar o solo preparado para receber as mudas ou sementes e também realizar a correção do solo são medidas geralmente necessárias. O plantio deve estar de acordo com a época e quantidade de sementes ou mudas por hectare, tratos culturais, por meio de adubações de cobertura, reposição anual de nutrientes, controle de pragas e plantas invasoras. O correto manejo das pastagens permite otimizar o sistema produtivo e garantir a sua sustentabilidade, visando uma melhor produção animal por hectare e a preservação das características físico-químicas do solo, reciclando nutrientes e controlando a erosão (20).

O pastejo contínuo é mais utilizado em sistemas extensivos, onde o rebanho tem acesso a toda a área da pastagem durante toda a estação de crescimento. A utilização do pasto dessa forma favorece ao menor aproveitamento da forragem produzida. Por outro lado, menores custos com infraestrutura são exigidos.

O sistema de pastejo rotacionado tem apresentado bons resultados, uma vez que explora o potencial forrageiro ao máximo em menor espaço. O produtor que optar por esse sistema em sua propriedade, deve entender que para intensificar a produção, algumas condições devem ser atendidas, tais como: disponibilidade de água, solos férteis, animais com bom potencial genético, gramíneas produtivas, cercas adequadas, controle sanitário (principalmente das verminoses), sendo o apoio em assistência técnica necessário para o sucesso do sistema (33).

Ao avaliar o fluxo de biomassa em *Panicum maximum* cv. Tanzânia sob lotação rotativa por ovinos com três períodos de descanso (1,5; 2,5 e 3,5 novas folhas por perfilho), Cândido et al. (35) observaram que os ovinos mantidos sob o período de descanso para 1,5 novas folhas por perfilho apresentaram desempenho superior (124,94 g/dia) comparado a 3,5 novas folhas por perfilho (55,48 g/dia) ($P < 0,05$). A lotação para o tratamento 3,5 folhas por perfilho suportou maior número de animais (74,26 ovinos/ha) em relação ao tratamento 1,5 folhas por perfilho de período de descanso (58,79 ovinos/ha) ($P < 0,05$). A maior capacidade de suporte observada para o período de descanso com 3,5 novas folhas por perfilho deve ser analisada com atenção, pois embora suporte maior número de ovinos por hectare a produtividade é baixa, o que resulta em menor rendimento (35).

A EMBRAPA Caprinos e Ovinos conduziu trabalhos verificando a terminação de ovinos em sistema rotacionado, irrigado e adubado com capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. tanzania) e capim-gramão (*Cynodon spp.*). A taxa de lotação variou de 40 a 60 ovinos/ha/período, com um ganho de peso diário variando de 60 a 159 gramas o que proporcionou produções de 3600 a 4800 kg de PV/ha (33).

Dependendo da fase de crescimento do animal, como cria ou engorda, estimular o ganho de peso contribui para a eficiência do processo. Em casos de ritmos de crescimento modestos, o desempenho não é tão eficiente, pois muita forragem ingerida é utilizada em processos não produtivos (manutenção). Um animal com baixo ganho de peso diário leva três vezes mais tempo para alcançar o ponto de abate e consome, aproximadamente, duas vezes mais alimento do que um cordeiro cujo potencial não esteja sendo limitado (36).

A oferta de forragem que maximiza o desempenho de cordeiros é quatro vezes superior ao seu nível de ingestão, ou seja, para um cordeiro conseguir preencher a sua capacidade de consumo é necessário oferecer a ele, no pasto, quatro vezes mais do que aquilo que efetivamente ele vai consumir (33).

Um dos problemas enfrentados ao realizar o sistema de pastejo rotacionado é o controle de parasitas gastrintestinais. Na ovinocultura, as categorias mais susceptíveis aos efeitos do parasitismo são os cordeiros desmamados e as ovelhas no final da gestação e início da lactação pela depressão do sistema imunológico. Com o objetivo de se prevenir e/ou diminuir a contaminação das pastagens, uma vez que menos de 5% da população parasitária encontra-se dentro dos animais e 95% no pasto, tem-se utilizado o pastejo alternado de ovinos com bovinos como estratégia importante para reduzir essa infestação no pasto (37,38).

5.2. Suplementação estratégica a pasto

Para os sistemas de produção a pasto, estrategicamente pode-se trabalhar com a suplementação estratégica (39). É importante conhecer as categorias cujas exigências nutricionais são mais elevadas, caso de fêmeas no terço final do período de gestação, fêmeas no início do período de lactação, cordeiros/cabritos em crescimento, matrizes e carneiros em atividade reprodutiva. Também merece atenção a escolha de suplementações concentradas específicas para essas categorias. Na prática, um excelente índice que permite o acompanhamento da nutrição dos rebanhos é o escore corporal associado com as pesagens, realizados em intervalos semanais, quinzenais ou mensais, conforme o manejo dos rebanhos nas propriedades (40).

Otimizar o quantitativo do rebanho efetivamente produtivo pode também ser uma estratégia para o uso dos alimentos disponíveis. O descarte orientado de animais com baixa produção, com problemas sanitários e/ou reprodutivos é um bom começo. Esse descarte deve ficar entre 20-30% do rebanho. Na sequência, a seleção por animais adaptados às condições de criação específicas para cada região brasileira (mais eficientes no uso dos alimentos), com habilidade materna, na perspectiva de produção de crias mais pesadas à desmama (no caso de rebanhos para corte) são avanços importantes no contexto do descarte orientado.

A mistura múltipla, por exemplo, é uma alternativa de suplementação alimentar com a finalidade de corrigir a deficiência nutricional severa das pastagens na época seca, permitindo, desta forma, que o rebanho se mantenha produtivo durante o ano todo. Quando as pastagens secam, perdem a qualidade, apresentando maior proporção de material fibroso e, com isso, se tornam de menor valor nutritivo. Mesmo ingerindo grande volume de matéria seca, algumas exigências nutricionais não são plenamente atendidas. Há perda de peso e queda no desempenho dos animais de corte e animais leiteiros (40).

O uso da mistura múltipla aumenta a digestão da pastagem seca. Isso porque a mistura contém ureia, fonte barata de amônia e, conseqüentemente, de nitrogênio para a síntese de proteínas pelas bactérias ruminais, o que estimula o processo digestivo microbiano e conseqüentemente resulta na melhoria da digestão da pastagem seca (40).

As misturas múltiplas também podem ser utilizadas para se aproveitar restos de palhadas secas, oriundas da colheita de cereais, como alimento alternativo na estratégia de reduzir o custo da alimentação sem afetar o desempenho zootécnico de caprinos e ovinos. A mistura é barata e fácil de ser preparada. Para produzir 100 kg, basta seguir as recomendações da tabela a seguir (Tabela 5):

Tabela 5. Recomendação de mistura múltipla para ovinos

| Componentes | 1ª semana | 2ª semana | 3ª semana |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Milho moído | 25kg | 25kg | 25kg |
| Farelo de soja | 36,9kg | 33,8kg | 29,7kg |
| Uréia | 3,0kg | 6,0kg | 10,0kg |
| Enxofre | 0,09kg | 0,18kg | 0,30kg |
| Sal comum | 15kg | 15kg | 15kg |
| Suplemento mineral (sem sal) | 20kg | 20kg | 20kg |
| Total | 100kg | 100kg | 100kg |

Fonte: Ferreira et al. (40)

O custo por quilo de suplemento varia de R\$ 0,97 a R\$ 1,10 e o custo por animal/dia varia de R\$ 0,08 a R\$ 0,11 e dependem do custo dos insumos na região. A mistura deve ser

bem feita para que o produto final fique homogêneo. O consumo diário de um animal adulto é de 60g a 80g e, para a categoria mais jovem, de 20g a 30g.

A ureia em alta concentração pode ser tóxica. Por isso seu uso não é recomendado na época das águas, quando pode se dissolver no cocho após uma chuva e colocar os animais em risco de se intoxicarem. O processo de intoxicação se caracteriza por incoordenação motora, tremores musculares, colapso e morte. O consumo rápido de ureia por caprinos e ovinos não adaptados oferece o mesmo risco de intoxicação. Sugere-se, portanto, seguir a recomendação demonstrada anteriormente (Tabela 5).

Caso os animais fiquem sem acesso à mistura múltipla contendo ureia por mais de três dias consecutivos, deve-se adotar o esquema da adaptação novamente, começando da primeira semana. Por isso é muito importante manter o cocho com boa quantidade da mistura diariamente. Após o período de adaptação, a mistura pode ser disponibilizada à vontade, pois o consumo é regulado pela ureia, que é amarga, e pelo sal branco, para o qual os animais têm apetite específico e não ingerem quantidades muito altas (40).

5.3. Produção de pequenos ruminantes em confinamento

O confinamento de caprinos e ovinos está em crescimento no Brasil, embora essa prática seja mais adotada para bovinos. O uso de dietas com alto teor de concentrados caracteriza esse sistema de produção. Para que seja rentável ao produtor, cabe a ele executar um bom planejamento alimentar permitindo adquirir os insumos alimentares em períodos cuja oferta elevada permita um custo de aquisição menor, observando-se a disponibilidade local e a constância na oferta quantitativa ao longo do ano (41). O confinamento possibilita a produção de carne de cordeiro/cabrito com maior rapidez e ao mesmo tempo pode permitir o melhor controle de endoparasitoses, desde que as medidas sanitárias de higiene, limpeza e desinfecção das instalações utilizadas sejam respeitadas (42).

Sobre a terminação de pequenos ruminantes em confinamento, alguns trabalhos serão apresentados no sentido de ilustrar as alternativas alimentares e de dietas para confinamento utilizando-se de alimentos tropicais.

Ao avaliar o uso da polpa cítrica úmida em substituição a silagem de milho para ovinos em confinamento, verificou-se que não houve ($P>0,05$) diferenças quanto ao consumo, podendo a polpa cítrica substituir em até 75% a silagem de milho, com ganhos de peso mais satisfatórios com 48% de substituição (41). Em estudo com ovinos Morada Nova, avaliou-se o desempenho e a digestibilidade desses animais em confinamento alimentados com teores crescentes de concentrado na dieta (20 a 80%). Foi observada redução do tempo em confinamento ($P<0,05$) de 123,37 dias para dietas com 20% de concentrado para 52,50 com 80%. Houve aumento do consumo de matéria seca com o aumento de concentrado, assim como o ganho de peso, a conversão e eficiência alimentar (43).

Estudando a influência da inclusão de níveis crescentes de subproduto de abacaxi em dietas experimentais isofibrosas e isoproteicas para ovinos, concluiu-se que sendo incluído em até 28% do total dietético não houve riscos de diminuição do pH ruminal. A utilização do subproduto de acerola, por sua vez, apesar dos balanços nitrogenados positivos, reduziu o consumo da maioria dos nutrientes dietéticos e deve ser incluído em, no máximo, oito por cento do total de dietas para ovinos (44).

Considerando-se o subproduto de maracujá, Rogério (44) relatou ainda que houve limitação de consumo da maior parte dos nutrientes, entretanto, o consumo de FDN, como porcentagem da matéria seca ingerida, representou em média 49,79%, o que possibilitou uma distribuição mais uniforme de energia entre as dietas experimentais. O aumento do consumo de FDA, como porcentagem da matéria seca ingerida, também resultou no aumento da inclusão de lignina. Portanto, a inclusão deve ser de até 18% do total das dietas.

Para o subproduto de caju, ao avaliarem o desempenho, a digestibilidade e o balanço de nitrogênio e analisar a viabilidade econômica da inclusão de polpa de caju desidratada na alimentação de ovinos em confinamento recebendo dietas contendo cinco níveis de subproduto de caju desidratado (0%, 10%, 20%, 30% e 40%), observou-se que o ganho de peso decresceu proporcionalmente com o aumento da inclusão do subproduto de caju (45). Para o subproduto de abacaxi, foi constatado que, se incluído em até 16% do total de dietas para ovinos, não há risco de limitação de consumo e digestibilidade dos nutrientes dietéticos (44). A digestibilidade da matéria orgânica indicou excelente fração de NDT para as dietas que incluíram o subproduto de abacaxi em até 16%. Considerando-se a digestibilidade da proteína bruta, as dietas em que se incluiu o subproduto de abacaxi apresentaram valores semelhantes aos do grão de soja (65%).

O subproduto de caju representou prejuízo quando incluído em níveis superiores a 19% do total dietético, principalmente no tocante ao aproveitamento das frações fibrosas e proteicas. Os altos níveis de fibra existentes no subproduto de caju foram determinantes para o aumento dos consumos de FDN e FDA com a inclusão crescente de subproduto, mesmo assim não ocorreu aumento proporcional do consumo de matéria seca diante da baixa digestibilidade desse nutriente. Deve-se considerar que houve queda brusca do balanço nitrogenado, quando foi ultrapassado o percentual de 19%, quando praticamente chegou a zero na dieta que incluiu 52% de subproduto de caju. A presença de compostos polifenólicos, tais como taninos e lignina, podem ter indisponibilizado a proteína dietética e assim ter promovido a redução da retenção de nitrogênio (44).

Visando a quebra da parede celular presente no subproduto de caju com consequente melhoria da disponibilização de nutrientes solúveis e visando também avaliar os riscos de acidose em dietas com subproduto de caju incluídos de 11 a 33% em dietas de cordeiros em terminação, Costa (46) realizou a moagem do referido subproduto em 3 mm (moído finamente) e 19 mm (moído grosseiramente). O autor constatou que o grau de moagem aplicado ao subproduto de caju não afetou os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo e das frações fibrosas. Definiu que a inclusão do subproduto de caju em até 33% do total dietético, considerando-se os graus de moagem testados, não representou riscos para a queda do pH do líquido ruminal.

Trabalhando com subproduto de caju amonizado ou não com ureia, verificou-se que o tratamento químico com ureia não aumentou os consumos de matéria seca e matéria orgânica e que inclusão do subproduto de caju tratado com ureia em 21% do total dietético reduziu o consumo de proteína bruta e do extrato etéreo digestível. A inclusão do subproduto de caju tratado com ureia aumentou o consumo de FDN, FDA e HCEL, mas não aumentou o consumo de CEL, reduzindo a digestibilidade do extrato etéreo e aumentando a digestibilidade da FDN e FDA (47).

Já ao avaliarem a composição químico-bromatológica e fermentativa de silagens contendo zero, cinco, 10, 15 e 20% do subproduto da polpa de melão, verificaram-se elevações nos teores de matéria seca, o que permitiria uma boa condição para o processo fermentativo. Entretanto, os autores observaram que o processo fermentativo não ocorreu de forma satisfatória, pois com a adição do subproduto, os valores de pH se elevaram e atingiram níveis que caracterizam silagens de baixa qualidade. Os autores observaram ainda que a adição de subproduto elevou os teores de proteína bruta das silagens (48).

Ao avaliar a adição de subproduto de banana às dietas de ovinos, observou-se que os consumos diários de MS não foram influenciados por essa inclusão. Embora o FDN dietético tenha reduzido e os teores de PB tenham aumentado com a inclusão crescente do subproduto de banana às dietas, esses componentes bromatológicos não foram suficientes para alterar o consumo de MS. Há que se destacar também que embora o teor de PB das dietas tenha elevado com a adição de subproduto de banana, a disponibilidade de nitrogênio foi reduzida,

pois os teores de NIDA elevaram de 26,5 para 37,5% quando se comparou a dieta exclusiva de feno de capim *Tifton 85* com aquela contendo 80% de subproduto de banana (49).

O Farelo de Castanha de Caju (FCC) é um alimento rico em energia (lipídios), entretanto, Rodrigues et al. (50) quando forneceram dieta composta por 70% de volumoso e 30% de concentrado contendo FCC para ovinos verificaram efeito linear negativo no consumo de matéria seca. Relacionaram aos lipídios existentes no subproduto e possíveis efeitos sobre a digestibilidade das frações fibrosas.

Avaliando dietas contendo ou não FCC fornecidas para três grupos genéticos de ovinos (½ sangue Dorper, ½ sangue Somalis e ½ sangue Santa Inês), Silva (51) não percebeu alteração do pH do líquido ruminal considerando-se a dieta que incluiu o farelo de castanha de caju em relação à dieta controle. Entretanto, verificou que a inclusão do FCC promoveu redução das concentrações de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, nos grupos genéticos ½ sangue Dorper e ½ sangue Somalis não tendo sido evidenciado esse efeito sobre o grupo genético ½ sangue Santa Inês. Complementarmente a essa informação, o autor identificou valores de proteínas totais séricas inferiores àqueles recomendados pela literatura e, em mensurações de concentrações de ureia sérica, relatou possíveis diferenças na disponibilização de compostos nitrogenados e carboidratos no processo fermentativo ruminal. Sob essas condições, Nascimento et al. (52) verificaram que a inclusão do FCC influenciou ($P < 0,05$) o consumo de nutrientes. Diferenças de consumo entre os grupamentos genéticos avaliados (½ Dorper x ½ SPRD, ½ Somalis Brasileira x ½ SPRD e ½ Santa Inês x ½ SPRD) resultaram em maior consumo para os animais ½ Dorper x ½ SPRD, seguidos pelos animais ½ Somalis Brasileira x SPRD e depois pelos ½ Santa Inês x ½ SPRD. O ganho de peso médio diário foi menor para os grupos genéticos em cujas dietas houve adição de FCC o que implicou em redução do rendimento de carcaça. Entre os grupos genéticos avaliados, os ovinos ½ Dorper x ½ SPRD apresentaram maior taxa de ganho de peso médio diário.

Avaliando dietas contendo silagem do pasto nativo do Nordeste brasileiro e soro de leite bovino em níveis crescentes de inclusão em dietas para ovinos, constatou-se que a inclusão desse subproduto em dietas para ovinos proporcionou níveis de concentração de nitrogênio amoniacal considerados ótimos para um adequado funcionamento ruminal, notadamente no máximo nível de inclusão testado que foi de 6,9% na matéria seca (53). Araújo et al. (54), também avaliando a inclusão em níveis crescentes de soro de leite bovino em dietas para caprinos, verificaram que a utilização de soro nos níveis estudados não promoveu redução do pH do líquido ruminal nessa espécie. Costa et al. (55), ao avaliarem o subproduto de urucum (resíduo da produção de corantes) em dietas para ovinos, relataram que as concentrações de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) foram aquém dos níveis considerados ótimos para uma adequada fermentação ruminal. Esses autores verificaram também maiores consumos de matéria seca e de proteína bruta, inclusive superiores aos recomendados pelo NRC (8) para a categoria animal estudada.

Rogério et al. (39) compararam ambas as versões do NRC (versões de 1985 e de 2007) para uso na formulação de dietas de cordeiros em terminação em termos de viabilidade econômica de uso, extrapolada para a terminação de 150 cordeiros. As dietas foram compostas de silagem preparada a partir do pasto nativo da caatinga, farelo de soja, milho moído, subproduto de urucum e calcário. Os indicadores econômicos indicaram o uso do NRC (8) como mais rentável com melhor valor presente líquido e melhor taxa interna de retorno (17,20%) com um período de retorno do investimento inicial de 5 meses considerando uma taxa anual fixa de 6%. A análise de sensibilidade financeira indicou que a variação de até 5% no preço dos insumos para mais não implicou em inviabilidade financeira do sistema. Quando essa variação foi simulada em 10%, a inviabilidade financeira foi constatada. Sob a condição do NRC (8) com 20% de consumo de proteína não degradável no rúmen, os cordeiros mestiços utilizados apresentaram ganho de peso médio diário de 310 gramas/dia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entender o comportamento alimentar de pequenos ruminantes é o ponto de partida para o sucesso dos sistemas de produção nos trópicos. Garantir o consumo adequado, a partir da oferta de alimentos cuja constância, disponibilidade regional, custo de aquisição e qualidade nutritiva sejam respeitadas, é outro aspecto importante para a produção de pequenos ruminantes nos trópicos. Por outro lado, trabalhar a questão do planejamento alimentar, manejo com suplementações estratégicas considerando as exigências nutricionais conforme as categorias produtivas e a relação custo:benefício das dietas utilizadas em termos de desempenho animal são também fatores que merecem destaque e atenção pelos produtores e técnicos. O apoio técnico, especialmente quanto à formulação de dietas balanceadas e suplementos específicos para as diferentes condições de pastagens brasileiras, contribuirá para o sucesso da alimentação de pequenos ruminantes.

7. REFERÊNCIAS

1. Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press; 1994.
2. Resende KT, Teixeira IAMA, Biagioli B, Lima LD, Boaventura NO, Perreira Júnior JD. Progresso científico em pequenos ruminantes na primeira década do século XXI. Rev Bras Zootec. 2010;39:369-75.
3. Ben Salem H. Nutritional management to improve sheep and goat performances in semiarid regions. Rev Bras Zootec. 2010;39:337-47.
4. Bonfim MAD, Oliveira LS, Fernandes MF. Uso da nutrição para a diferenciação e a valorização da qualidade do leite e da carne: um novo paradigma na nutrição de pequenos ruminantes. In: Anais do 1º Congresso Nacional de Nutrição; 2008; Fortaleza. Fortaleza: CNN; 2008.
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas sobre pecuária, rebanho e produção nacional [Internet]. Sobral: IBGE; 2009 [cited 2011 Jan 02]. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br>.
6. Agricultural and Food Research Council. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International; 1993.
7. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Nutrient requirements of domesticated ruminants. Collingwood: CSIRO Publishing; 2007.
8. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants. 1st ed. Washington: National Academy Press; 2007.
9. Tedeschi LO, Cannas A, Fox DG. A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: the development and evaluation of the small ruminant nutrition System. Small Rumin Res. 2010;89:174-84.
10. Rogério MCP. Alimentos alternativos para ovinos e caprinos. In: Anais do 3o Encuentro: Cabrerros y Ovejeros de los Andes; 2009; Medellín. Medellín: Universidad CES; 2009.

11. Carvalho GGP, Pires AJV. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. Arch Zootec. 2008;57:13-28.
12. Soares BC, Souza KDS, Lourenço Júnior JB, Maciel e Silva AG, Ávila SC, Kuss F, et al. Desempenho e características de carcaças de cordeiros suplementados com diferentes níveis de resíduo de biodiesel. Arq Bras Med Vet Zootec. 2012;64:1747-54.
13. Menezes BP. Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e composição bromatológica da torta de murumuru (*Astrocaryum murumuru* var. *murumuru* Mart.), na alimentação de ruminantes [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2012.
14. Rodrigues LS. Consumo, digestibilidade e balanço de nitrogênio da torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum) proveniente da agroindústria cosmética [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2012.
15. De Moraes M, Guimarães CMC, Passos LT, Miranda AS, Moraes MS, Lourenço Júnior JB, et al. Desempenho de cordeiros recebendo dietas contendo torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em substituição ao milho e farelo de trigo. Vet Zootec. 2011;18:1240-2.
16. Borges I, Gonçalves LC, Macedo Júnior GL, Ferreira MIC. Utilização de subprodutos da agroindústria na alimentação de caprinos e ovinos. In: Anais do 11º Simpósio Nordestino de Alimentação de Ruminantes; 2008; Aracaju. Aracaju: Sociedade Nordestina de Produção Animal; 2008.
17. Rogério MCP, Martins GA. Eficiência econômica da alimentação de ovinos e caprinos. In: Campos ACN. Do campus para o campo: tecnologias para a produção de ovinos e caprinos. 1a ed. Fortaleza: Gráfica Nacional; 2005. p.183-91.
18. Camurça DA, Neiva JNM, Pimentel JCM, Vasconcelos VR, Lôbo RNB. Desempenho produtivo de ovinos alimentados com dietas à base de feno de gramíneas tropicais. Rev Bras Zootec. 2002;31:2113-22.
19. Oliveira FR. Alternativas de alimentação para a pecuária no semiárido nordestino. In: Anais do 6º Simpósio Nordestino de Alimentação de Ruminantes; 1996; Natal. Natal: Sociedade Nordestina de Produção Animal; 1996.
20. Companhia do Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. Manual de criação de caprinos e ovinos. Brasília: CODEVASF; 2011.
21. Cezar MF, Sousa WH. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. In: Anais do Simpósio da 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2006; João Pessoa. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2006.
22. Neiva JNM, Cavalcante MAB, Rogério MCP. Uso do creep-feeding na criação de ovinos e caprinos. In: Anais do 8º Seminário Nordestino de Pecuária; 2004; Fortaleza. Fortaleza: Banco do Nordeste; 2004.

23. Sampaio AAM, Brito RM, Routman KS. Utilização de NaCl no suplemento com alternativa de viabilizar o creep feeding. In: Anais da 38ª Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2001; Piracicaba. Piracicaba: USP; 2001.
24. Garcia CA, Costa C, Monteiro ALG, Neres MA, Rosa GJM. Níveis de energia no desempenho e características da carcaça de cordeiros alimentados em creep feeding. Rev Bras Zootec. 2003;32:1371-9.
25. Ortiz JS, Costa C, Garcia CA, Silveira LVA. Efeito de diferentes níveis de proteína bruta na ração sobre o desempenho e as características de carcaça de cordeiros terminados em creep feeding. Rev Bras Zootec. 2005;34:2390-8.
26. Poli CHEC, Monteiro ALG, Barros CS, Moraes A, Fernandes MAM, Piazzetta HVL. Produção de ovinos de corte em quatro sistemas de produção. Rev Bras Zootec. 2008;37:666-73.
27. Borges I, Ferreira MIC, Albuquerque FHMAR, Macedo Júnior GL, Silva AGM. In: Anais do 1o Congresso Brasileiro do Santa Inês; 2005; Maceió. Maceió: ABSI; 2005.
28. Rogério MCP, Albuquerque FHMAR, Silva VL, Araújo AR, Oliveira DS. Manejo alimentar de cabras e ovelhas no periparto. In: Anais do 5º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte; 2011; João Pessoa. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2011.
29. Susin I. Exigências nutricionais de ovinos e estratégias de alimentação. In: Silva Sobrinho AG. Nutrição de ovinos. Jaboticabal: FUNEP; 1996. p.119-41.
30. Pimenta Filho EC, Mariz TMA, Gonzaga Neto SEA. Efeitos dos níveis de energia no período gestacional sobre o crescimento de cordeiros Morada Nova. Rev Cient Prod Anim. 2007;9:146-52.
31. Albuquerque FHMAR, Borges I, Neiva JNM. Exigências nutricionais e categorias de produção. In: Campos ACN. Do campus para o campo: tecnologias para a produção de ovinos e caprinos. 1a ed. Fortaleza: Gráfica Nacional; 2005. p.165-72.
32. Macedo Júnior GL, Pérez JRO, Almeida TRV, Paula OJ, França PM, Assis RM. Influência de diferentes níveis de FDN aparente de ovelhas Santa Inês. Cienc Agrotec. 2006;30:547-53.
33. Carvalho FC. Comportamento alimentar de caprinos e ovinos em sistemas intensivos de produção. In: Campos ACN. Do campus para o campo: tecnologias para a produção de ovinos e caprinos. 1a ed. Fortaleza: Gráfica Nacional; 2005. p.147-53.
34. Neiva JNM. Uso do pastejo rotacionado para produção de ovinos. In: Anais do 6o Seminário Nordeste de Pecuária; 2002; Fortaleza. Fortaleza: Banco do Nordeste; 2002.
35. Cândido MJD, Silva RG, Neiva JNM, Facó O, Benevides YI, Farias SF. Fluxo de biomassa em capim-tanzânia pastejado por ovinos sob três períodos de descanso. Rev Bras Zootec. 2006;35:2234-42.
36. Vipond J. Finishing lambs at pasture. Grass Farmer. 1999;63:6-7.

37. Fernandes LH, Seno MCZ, Amarante AFT, Souza H, Belluzzo CEC. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;56:733-40.
38. Souza H, Seno MCZ, Fernandes LH, Valério Filho WV. Efeito de dois métodos de pastejo rotacionado no controle dos parasitas gastrintestinais e no desenvolvimento ponderal de cordeiros do nascimento ao desmame. *Semina Cienc Agrar*. 2005;26:93-102.
39. Rogério MCP, Castro EM, Martins EC, Monteiro JP, Moraes Silva K, Cândido MJD, et al. Economical and financial analysis of lamb finishing fed with diets formulated according to the NRC (1985) and the NRC (2007). *Trop Anim Health Prod*. 2012;45:259-66.
40. Ferreira MI, Galvani DB, Rogério MCP. Estratégias para alimentação de ruminantes no semiárido brasileiro. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos; 2012.
41. Pereira MS, Ribeiro ELA, Mizubuti IY, Rocha MA, Kuraoka JT, Nakaghi EYO. Consumo de nutrientes e desempenho de cordeiros em confinamento alimentados com dietas com polpa cítrica úmida prensada em substituição à silagem de milho. *Rev Bras Zootec*. 2008;37:134-9.
42. Reis W, Jobim CC, Macedo FAF, Nunes ME, Cetato U. Características da carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo grãos de milho conservados em diferentes formas. *Rev Bras Zootec*. 2001;30:1308-15.
43. Medeiros GR, Carvalho FFR, Ferreira MA, Batista AMV, Alves KS, Júnior RJSM, et al. Efeito dos níveis de concentrado sobre o desempenho de ovinos Morada Nova em confinamento. *Rev Bras Zootec*. 2007;36:1162-71.
44. Rogério MCP. Valor nutritivo de subprodutos de frutas para ovinos [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
45. Dantas Filho LA, Lopes JB, Vasconcelos VR, Oliveira ME, Alves AA, Araújo DLC, et al. Inclusão de polpa de caju desidratada na alimentação de ovinos: desempenho, digestibilidade e balanço de nitrogênio. *Rev Bras Zootec*. 2007;36:147-54.
46. Costa JB. Efeito da inclusão do subproduto de caju (*Anacardium occidentale*, L.), submetido a diferentes graus de moagem, em dietas para cordeiros em terminação sobre o consumo e a digestibilidade de nutrientes [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2008.
47. Ribeiro TP. Valor nutritivo de dietas para ovinos contendo coproduto de caju amonizado ou não com ureia [dissertação]. Sobral: Universidade Estadual Vale do Acaraú; 2008.
48. Pompeu RCF, Neiva JNM, Cândido MJD, Oliveira Filho GS, Aquino DC, Lôbo RNB. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com adição de subprodutos do processamento de frutas tropicais. *Rev Cienc Agron*. 2006;37:77-83.

49. Clementino RH. Utilização de subprodutos agroindustriais em dietas de ovinos de corte: consumo, digestibilidade, desempenho e características de carcaça [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2008.
50. Rodrigues MM, Neiva JNM, Vasconcelos VR, Lobô RNB, Pimentel JCM, Moura AAAN. Utilização do farelo de castanha de caju na terminação de ovinos em confinamento. *Rev Bras Zootec.* 2003;32:240-8.
51. Silva VL. Avaliação nutricional da inclusão do farelo de castanha de caju em dietas de cordeiros mestiços [dissertação]. Sobral: Universidade Estadual Vale do Acaraú; 2010.
52. Nascimento EM, Rogério MCP, Batista ASM, Carneiro MSS, Vasconcelos AM, Leite ER, et al. Nutrient intake and quantitative aspects of carcass of finishing sheep fed with diets containing cashew nut meal. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2012;13:1099-111.
53. Primo TS, Costa HHA, Silva VL, Freire APA, Landim AV, Vasconcelos AM, et al. Concentrações de nitrogênio amoniacal em ovinos alimentados com dieta contendo silagem de pasto nativo do nordeste brasileiro e soro de queijo de leite bovino. In: *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Zootecnia; 2009; Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2009.*
54. Araújo AR, Ribeiro TP, Silva VL, Costa HHA, Landim AV, Vasconcelos AM, et al. pH do líquido ruminal de caprinos alimentados com dietas contendo soro de queijo de leite bovino em níveis crescentes de incluso. In: *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Zootecnia; 2009; Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2009.*
55. Costa HHA, Rogério MCP, Muir JP, Alves AA, Galvani DB, Pompeu RCFF, et al. Nutritional evaluation of lamb diets in a tropical setting formulated according to NRC (1985) and NRC (2007) specifications. *Small Rumin Res.* 2013;113:20-9.

Recebido em: 09/09/2014

Aceito em: 12/05/2016

MEGAESÔFAGO SECUNDÁRIO À MIASTENIA GRAVIS

Luiz Henrique de Araújo Machado¹

Natália Caroline Nalesso de Castro

Laura Carolina Barbosa

Fabíola Soares Zahn

RESUMO

Astenia esofágica ou megaesôfago é definido por uma dilatação patológica do esôfago e caracterizado por uma falha progressiva das ondas peristálticas. Essa doença pode ser classificada em: idiopática, congênita ou secundária adquirida. A causa mais comum de megaesôfago secundário adquirido é a miastenia gravis. Tal doença é caracterizada por ser uma neuropatia que desencadeia uma desordem neuromuscular, provocando fraqueza de musculatura esquelética, esôfago, faringe e laringe. A fraqueza muscular está correlacionada com melhora após o descanso e piora com o exercício. O megaesôfago adquirido secundário a miastenia gravis é caracterizado pelo rompimento do reflexo nervoso, controlador da deglutição ou que afeta o funcionamento da musculatura esofágica, levando a dilatação passiva do órgão. Raças como Pastor Alemão, Golden Retriever e Setter Irlandês possuem maior predisposição à doença.

Palavras-chave: megaesôfago, Miastenia Gravis, anticolinesterásico, dilatação.

MEGAESOPHAGUS SECONDARY TO MYASTHENIA GRAVIS

ABSTRACT

Esophageal asthenia or megaesophagus is defined as a pathological dilation and progressive failure of peristaltic waves. This disease can be classified in: idiopathic, congenity or acquired secondary. The most common cause of acquired secondary megaesophagus is myasthenia gravis. This disease is defined as a neuropathy that develops a neuromuscular disorder, resulting in muscle weakness, of the esophagus, of the larynx and of the pharynx. The muscle weakness is related to improvement after rest and worsening with exercise. The megaesophagus secondary to myasthenia gravis is defined to nervous reflex breakdown, swallowing controller or lesions that affect the esophageal muscle function, resulting in an organ passive dilation. Breeds like German Shepherd, Golden Retriever and Irish Setter have a greater predisposition to disease.

Keywords: megaesophagus, Myasthenia gravis, anticholinesterase, dilation.

MEGAESÓFAGO SECUNDARIO A LA MIASTENIA GRAVIS

RESUMEN

Astenia esofágica o megaesófago se define por una dilatación patológica del esófago y caracterizado por una insuficiencia progresiva de las olas peristálticas. Esta enfermedad se puede clasificar en: idiopática, congénita o adquirida secundaria. La causa más común del megaesófago secundario es Miastenia gravis. Esta enfermedad se caracteriza por ser una

¹ Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ UNESP BOTUCATU. Contato principal para correspondência. <http://www.fmvz.unesp.br/dermatovet/>

neuropatía que desencadena un trastorno neuromuscular que causa debilidad del músculo esquelético, el esófago, la faringe y la laringe. La debilidad muscular se correlaciona con la mejoría tras el descanso y empeora con el ejercicio. El megaesófago secundario adquirido a la miastenia gravis se caracteriza por la interrupción del reflejo nervioso, controlador de la deglución que afecta el funcionamiento de los músculos del esófago, lo que lleva a la dilatación pasiva del órgano. Razas como Pastor Alemán, Golden Retriever y Setter Irlandés tienen una mayor predisposición a la enfermedad.

Palabras clave: megaesófago, Miastenia Gravis, anticolinesterasa, la dilatación.

INTRODUÇÃO

Astenia esofágica ou megaesófago é definido por uma dilatação patológica do esôfago e caracterizado por uma falha progressiva das ondas peristálticas (1). Essa doença pode ser classificada em: idiopática, congênita ou secundária adquirida (2).

Uma das principais causas do megaesófago secundário adquirido é a miastenia gravis. Esta doença é um distúrbio neuromuscular, evidenciado por fraqueza e que se intensifica com o exercício e apresenta melhora com o repouso (3).

Há duas formas descritas da doença, a forma congênita e a adquirida. A forma congênita se caracteriza por uma deficiência hereditária nos receptores de acetilcolina nas membranas pós-sinápticas da musculatura esquelética. A forma adquirida é caracterizada por ser uma doença imunomediada, na qual há a presença de anticorpos dirigidos contra os receptores de acetilcolina na junção neuromuscular. Ocorre a redução da sensibilidade da membrana pós-sináptica de transmissão de acetilcolina, uma vez que há a ligação desses anticorpos aos receptores (4).

O prognóstico para o megaesófago secundário a miastenia gravis é reservado e a principal complicação dessa enfermidade é a pneumonia aspirativa (1).

O presente trabalho tem como objetivo esclarecer a causa, os sinais clínicos, a frequência, possíveis tratamentos e o prognóstico do megaesófago secundário a miastenia gravis.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Megaesófago

Megaesófago pode ser definido pela diminuição ou ausência de forma acentuada de plexos nervosos intramurais do esôfago, esta alteração leva a um distúrbio motor esofágico à deglutição e a dilatação do órgão geralmente ocorre quando a perda celular está entre 50% e 95%, o que gera uma progressiva desorganização de toda a atividade motora do esôfago (5).

O esôfago tem como função primordial o transporte de líquidos e sólidos ingeridos da cavidade oral até o estômago, e as estruturas que possibilitam que esta função ocorra são os músculos estriados do esfíncter superior do esôfago, os músculos estriados e lisos do corpo esofágico e o músculo liso do esôfago (6).

Uma vez que o alimento estimula os neurônios sensoriais aferentes na mucosa esofágica, dá-se início ao reflexo de motilidade do esôfago. Os neurônios sensoriais aferentes enviam mensagens para o centro da deglutição no tronco cerebral pelo nervo vago e então os neurônios motores enviam estímulos eferentes via nervo vago que irão estimular a contração dos músculos liso e estriado do esôfago, portanto qualquer lesão neste trajeto pode levar a uma hipomotilidade e distensão esofagiana. Como a motilidade esofágica encontra-se diminuída, ocorre um acúmulo de líquido e alimentos no esôfago, sendo por isso o

megaesôfago uma das principais causas de regurgitação nos animais (3). O megaesôfago pode ser de etiologia congênita, idiopática ou secundária adquirida (7).

Raças como Pastor Alemão, Dogue Alemão, Golden Retriever, Setter Irlandês, Fox Terrier e Schnauzer apresentam predisposição hereditária à doença. Em gatos, a predisposição racial ocorre com a raça Siamesa, entretanto é uma enfermidade de ocorrência relativamente rara nessa espécie, devido possivelmente à concentração de fibras musculares lisas no esôfago felino (7,8).

O megaesôfago de origem congênita não tem uma causa definida, não há sinais de desmielinização ou degeneração neuronal e a inervação vagal eferente aparentemente se encontra dentro da normalidade, embora estudos apontem para uma possível deficiência na inervação vagal aferente para o estômago (4,9). Ocorre uma dilatação generalizada do esôfago levando a regurgitação e comprometimento do desenvolvimento do filhote logo após o desmame (9).

O megaesôfago de etiologia idiopática é diagnosticado principalmente em cães de médio e grande porte, acometendo geralmente animais que sofreram algum estresse considerável, como fraturas e traumatismo, sendo de ocorrência relativamente rara em raças pequenas (7). Sua maior concentração de ocorrência é em cães adultos entre 7 a 15 anos de idade (6).

O megaesôfago secundário adquirido é consequência de causas primárias que acarretam alterações motoras no esôfago ou no esfíncter gastroesofágico, levando a sua dilatação passiva (7). As causas primárias geralmente são miastenia gravis, lupus eritematoso, polimiosite, polineurite, neuropatias degenerativas, hipoadrenocorticismo, hipotireoidismo, deficiência de tiamina, tumores como o timoma, mielopatia cervicais e intoxicações por metais pesados (8).

Há ainda os megaesôfagos parciais decorrentes de estenoses, que podem ser de origem intrínseca ou ainda extrínseca como a persistência do arco aórtico direito. A persistência do arco aórtico direito é uma alteração congênita secundária a uma anormalidade na formação vascular do animal e é a mais frequente das estenoses extrínsecas (8).

O principal sinal clínico do megaesôfago é a regurgitação de alimento e água. É de extrema importância diferenciar regurgitação de vômito, a primeira o alimento não atinge o estômago, portanto não ocorre sua digestão, o alimento é eliminado de forma retrógrada passiva do esôfago, já no vômito, o alimento é digerido e eliminado pelas atividades coordenadas do sistema gastrointestinal, musculoesquelético e nervoso, portanto é uma eliminação ativa do alimento. A regurgitação pode variar de um episódio a vários episódios por dia e geralmente ocorre de minutos a horas após a ingestão de alimentos (1,3,6). São também observados perda de peso, porém o animal não apresenta anorexia, há prejuízos no crescimento, hipersalivação, halitose, saliência do esôfago na entrada torácica, dor associada à palpação do esôfago, várias tentativas de deglutição com extensão ou torção da cabeça e pescoço. Uma das complicações secundárias ao megaesôfago é a pneumonia aspirativa, devido a isso o animal pode manifestar sinais respiratórios como tosse, dispneia, crepitação pulmonar, cianose e taquipnéia (3,4).

O diagnóstico consiste na avaliação dos sinais clínicos, na realização de um exame físico apurado da cavidade oral, região cervical, auscultação pulmonar, no intuito de procurar transtornos orofaríngeos, dilatação ou obstrução na porção cervical do esôfago e possíveis sinais de pneumonia aspirativa (10). Realiza-se hemograma, bioquímica sérica e exame de urina a fim de se pesquisar possíveis causas secundárias como hipoadrenocorticismo, sugerido pela hiponatremia e hipercalemia, a hipercolesterolemia é sugestivo de hipertireoidismo e a elevação da creatina cinase pode ser um indicativo de um distúrbio muscular primário. Outros exames mais específicos envolvem a titulação de anticorpos contra receptores de acetilcolina para a triagem de miastenia gravis adquirida, a titulação de anticorpos antinuclear para avaliação de lupus eritematoso sistêmico, a estimulação com hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) para avaliar a funcionalidade da adrenal, nível de tiroxina (T4), hormônio

estimulante da tireoide (TSH), para uma análise da tireoide e níveis sanguíneos de chumbo e colinesterase para uma avaliação de uma possível intoxicação por fosforado e carbamato, de caráter crônico. Caso nenhuma doença metabólica ou sistêmica seja encontrada, as únicas alterações que devem aparecer são a leucocitose devido à inflamação esofágica ou a pneumonia aspirativa e a hipoproteinemia devido à má nutrição (3,6).

A radiografia simples deve ser realizada na região cervical e torácica, uma vez que na região torácica pode indicar sinais de pneumonia aspirativa, efusão pleural, mediastinite ou pneumotórax. Na radiografia cervical o esôfago irá aparecer dilatado com acúmulo de gás, fluido ou ingesta e pode ocorrer um deslocamento ventral da traqueia e do coração em consequência do aumento do órgão. Caso não consiga definir o diagnóstico com a radiografia simples, então a radiografia contrastada é indicada. O sulfato de bário ou o iodo são os contrastes que podem ser utilizados e a dilatação esofágica será demonstrada de forma bem evidente na imagem radiográfica. A endoscopia é outra possibilidade de exame (4,10).

Miastenia gravis

A miastenia gravis é caracterizada por ser uma neuropatia que provoca uma desordem neuromuscular, cuja principal consequência é a fraqueza dos músculos esqueléticos, esôfago, faringe e ou laringe (11,12).

A junção neuromuscular é composta por uma membrana pré-sináptica localizada na porção terminal do neurônio motor e são encontradas nesta membrana vesículas que armazenam o neurotransmissor acetilcolina. Entre o neurônio motor e a fibra muscular encontra-se a fenda sináptica, e na célula muscular há a membrana pós-sináptica, a qual possui os receptores de acetilcolina (13).

A liberação da acetilcolina das vesículas é estimulada pela chegada de um potencial de ação na terminação nervosa motora. Tal potencial de ação é desencadeado pela troca de íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) por meio dos canais de sódio e potássio do axônio voltagem dependente. Conforme este potencial de ação atinge a membrana pré-sináptica, ocorre a abertura de canais de cálcio (Ca^{++}) dependentes de voltagem, levando a penetração de íons cálcio na membrana pré-sináptica e este aumento de cálcio é fundamental para a liberação da acetilcolina das vesículas. Então a acetilcolina difunde-se pela fenda sináptica e se liga ao receptor nicotínico de acetilcolina na membrana pós-sináptica na célula muscular. Após esta ligação, ocorre a abertura do canal de Na^+ que se distribui pelas células e provoca a geração de um potencial de ação que se difunde por toda a fibra muscular e causa a liberação intracelular de cálcio, o qual induz a contração muscular (12,13).

A miastenia gravis é caracterizada por duas formas, a congênita e a adquirida. A forma congênita é caracterizada pelo déficit hereditário de receptores de acetilcolina nas membranas pós-sinápticas da musculatura esquelética, e é mais comumente encontrada em raças como Springer Spaniel ingleses, Fox Terriers de pelo macio e Jack Russel, sendo rara em gatos. Os sinais clínicos geralmente ocorrem no período que varia de 6 a 9 semanas de idade (14).

A forma adquirida é definida por ser uma doença de caráter imunomediada comum. Nessa forma da doença há anticorpos que se dirigem aos receptores de acetilcolina e ligam-se a eles, reduzindo desta forma a sensibilidade da membrana pós-sináptica de transmissão de acetilcolina. As raças mais acometidas são Pastores Alemães, Golden Retrievers, Labrador Retrievers e Daschshunds. Pode acometer animais de todas as idades, mas possui um caráter bimodal acometendo, em sua maioria, animais jovens de 2 a 3 anos e animais mais velhos de 9 a 10 anos, aproximadamente. É raro em gatos, mas as raças felinas mais predispostas são os Abissínios e os Somalis (12,15).

O sinal clínico característico dessa enfermidade é a fraqueza muscular que piora com o exercício e melhora com o repouso. Podem ser observados outros sinais como regurgitação devido ao megaesôfago, hipersalivação, disfagia devido à fraqueza da musculatura faringiana,

disfonia devido à fraqueza laringeana, dificuldade em fechar as pálpebras, ventroflexão do pescoço devido a fraqueza dos músculos faciais (16). Geralmente o estado mental, os reflexos e as reações posturais encontram-se dentro da normalidade em casos leves (14).

A miastenia gravis adquirida pode ser classificada segundo a sua apresentação clínica em focal, generalizada e aguda fulminante. A forma focal acarreta no desenvolvimento de megaesôfago sem astenia apendicular, e os cães apresentam astenia faríngea, laríngea e/ou facial, e também podem apresentar reflexo palpebral fatigável. Esta forma é observada em 40% dos cães e 14% dos gatos acometidos. A forma generalizada caracteriza-se por uma debilidade muscular esofágica, facial, faríngea ou laríngea, com uma notável astenia muscular apendicular, que pode ser predominante ou exclusiva dos membros pélvicos ou similar entre membros torácicos e pélvicos. Por fim, na forma aguda fulminante ocorre uma astenia muscular apendicular grave de aparecimento súbito. Caracteriza-se por debilidade da musculatura esofagiana, facial, faríngea ou laríngea. Geralmente está relacionada com megaesôfago grave e pneumonia por aspiração. Fatores estes, que podem levar à insuficiência respiratória e ao óbito (15,16).

O diagnóstico é realizado pelo histórico, exame clínico e o teste confirmatório de imunoprecipitação por radioimunoensaio para a detecção de anticorpos circulantes no soro contra os receptores de acetilcolina. Não há correlação entre quantidade de anticorpos circulantes e a gravidade dos sinais clínicos. Este exame é positivo em 85% dos cães e gatos com a forma adquirida da doença e em 98% dos animais que possuem a miastenia gravis adquirida generalizada (12,15). Outro teste que pode ser realizado é a administração de medicamento anticolinesterásico como cloreto de edrofônio (Tensilon[®]), que é o fármaco de eleição, na dose de 0,1 a 0,2 mg/kg via intravenosa, ele apresenta uma ação rápida causando a melhoria da debilidade locomotora dentro de 20 a 60 segundos e até 5 minutos após sua administração, outro medicamento é o brometo de neostigmina na dose de 0,05 mg/kg via intramuscular, a resposta é observada dentro de 15 a 30 minutos. Esses medicamentos proporcionam uma melhora em segundos a minutos dos sinais de debilidade muscular, uma vez que os mesmos provocam a inibição da hidrólise da acetilcolina, pela união do fármaco com a acetilcolina, que fará com que esta hidrólise ocorra mais lentamente, permitindo assim um acúmulo de acetilcolina e maior tempo para que ela possa interagir com os receptores pós-sinápticos. O efeito desses medicamentos é o prolongamento e a exacerbação da atividade colinérgica. A ausência de resposta não elimina o diagnóstico de miastenia gravis, os resultados podem ser mais difíceis em animais com a forma focal, e em 50% dos casos da forma fulminante, não é obtido resposta, em virtude da grande destruição dos receptores de acetilcolina mediada pelos anticorpos. Em virtude da exacerbação colinérgica provocada por esses medicamentos, deve ser administrada como pré-medicação, a atropina (0,04 mg/kg intramuscular) para minimizar os efeitos colaterais muscarínicos (12,14,15).

Outros exames diagnósticos podem ser realizados como a biopsia muscular, a qual pode revelar por imunocitoquímica a presença de imunocomplexos na junção neuromuscular, o resultado positivo não é definitivo de miastenia gravis, porém um resultado negativo descarta a suspeita de miastenia. O eletrodiagnóstico é uma prova de estimulação nervosa repetitiva, a qual mensura a soma dos componentes do potencial de ação de grupos de fibras musculares pertencentes a uma unidade motora. Uma diminuição dos potenciais de ação à estimulação nervosa repetida é sugestiva de miastenia gravis. A desvantagem deste exame é a necessidade da administração de anestesia sendo que pacientes com megaesôfago, por exemplo, não devem ser submetidos a este procedimento devido ao risco de pneumonia por aspiração durante a fase de recuperação. Exames de imagem como radiografia de tórax podem ser realizados para avaliar a presença de megaesôfago, pneumonia aspirativa ou timoma. O timoma é um tumor identificado em 5% dos cães e 25% dos gatos com miastenia gravis adquirida, sendo assim, sempre que diagnosticado uma massa mediastinal cranial, a aspiração com agulha fina e a citologia são auxiliares no diagnóstico desta neoplasia. A presença de

doenças imunomediadas juntamente com a miastenia gravis é comum, tais como enfermidades como hipotireoidismo, trombocitopenia ou anemia hemolítica imunomediada, hiperadrenocorticismo e polimiosite (12,14,15).

A miastenia gravis também pode ocorrer como uma síndrome paraneoplásica relacionada com vários tumores como osteossarcomas, timomas, carcinoma hepático, adenocarcinoma do saco anal, linfoma cutâneo e neoplasias pulmonares primárias (12).

Megaesôfago adquirido secundário a miastenia gravis

A causa mais comum de megaesôfago adquirido secundário é a miastenia gravis. Este tipo de megaesôfago é provocado pelo rompimento do reflexo nervoso, controlador da deglutição, ou que afete o funcionamento do músculo esofágico, o que leva a dilatação passiva do órgão (6,17,18). Cães da raça Pastor Alemão, Golden Retriever e Setter Irlandês podem ter maior predisposição à doença (14).

Um estudo realizado em um hospital veterinário nos Estados Unidos revelou que em torno de 25% a 30% dos cães com megaesôfago idiopático, foram positivos para a miastenia gravis adquirida pelas provas de radioimunoensaio e imunoprecipitação (15). Também segundo Washabau (6), a miastenia gravis é responsável por ao menos 25% dos casos de megaesôfago secundário.

A regurgitação, e a perda de peso, podem ser sinais de manifestação da miastenia gravis, entretanto na ocorrência de megaesôfago secundário adquirido, a regurgitação é um dos vários sinais clínicos (6).

O tratamento baseia-se no manejo alimentar e no suporte para o megaesôfago. É recomendada uma alimentação pastosa e em uma plataforma elevada, de forma que o esôfago cervical e torácico permaneça em posição vertical durante a ingestão do alimento. Este posicionamento possibilita que a gravidade auxilie a passagem do alimento do esôfago para o estômago. Após a alimentação, este posicionamento deve ser mantido por pelo menos cinco a dez minutos. Oferecer refeições em pequenas quantidades várias vezes ao longo do dia auxilia na redução da retenção do alimento no esôfago, embora alguns animais possuam uma excelente resposta com alimentação seca *ad libitum* em plataforma elevada (19). Para os animais que não são capazes de manter um adequado “score” nutricional com a ingestão oral é recomendado o uso de sonda por gastrostomia temporária ou permanente. Há duas maneiras de colocação dessas sondas, mediante procedimento cirúrgico ou por meio da via percutânea com o auxílio do endoscópio (6). A sonda por gastrostomia auxilia na diminuição da ocorrência de pneumonia aspirativa, permite o balanço positivo de nitrogênio e auxilia no tratamento de esofagite, se esta estiver presente. Medicamentos pró-cinéticos e antiácidos podem ser utilizados para o tratamento do refluxo gastroesofágico, os de predileção são a cisaprida, 0,25 mg/kg e o omeprazol, 0,7 a 1,5 mg/kg (14).

Em relação à miastenia, as drogas anticolinesterásicas são utilizadas para o seu tratamento no intuito de aumentar a força muscular, uma vez que estes fármacos prolongam a ação da acetilcolina na junção neuromuscular devido à inibição da acetilcolinesterase (15). Em cães tem sido utilizado o brometo de piridostigmina (Mestinon[®]) na dosagem de 1 a 3 mg/kg por via oral a cada 8 horas, sua ação inicia uma hora após sua administração. Nos casos de cães que não suportam a administração da medicação devido ao grave megaesôfago, a alternativa é a utilização do metilsulfato de neostigmina (Prostigmin[®]), na dosagem de 0,04 mg/kg por via intramuscular a cada 6 ou 8 horas (14,15,20).

Em gatos a medicação de escolha é o xarope brometo de piridostigmina, na dosagem de 0,25 a 1,0 mg/kg, por via oral a cada 12 horas, para diminuir a irritação gástrica, deve-se diluir em água a medicação na concentração de 1:1. O ideal é que o horário da alimentação coincida com o pico de efeito do medicamento (14).

É muito importante diferenciar, os casos em que o animal está respondendo bem ao tratamento e apresenta uma piora súbita, crise miastênica, da crise colinérgica. A primeira deve-se à subdosagem anticolinesterásica. Enquanto a segunda deve-se à superdosagem do medicamento. Para diferenciá-las clinicamente é necessário administrar uma dose de edrofônio (Tensilon®). Nos casos de crise miastênica, o animal apresenta uma melhora após a administração do fármaco, já nos casos de crise colinérgica ocorre uma piora transitória ou nenhuma alteração, os ajustes das doses são realizados conforme a resposta obtida (14). Os anticolinesterásicos podem ser utilizados por toda vida e a dose diminuída gradualmente conforme a melhora dos sinais clínicos ou até mesmo serem totalmente suspensas, isto depende da resposta individual de cada animal (15).

Como a miastenia gravis adquirida é uma doença de caráter imunomediado o uso de corticosteroides e/ou drogas imunossupressoras compõe o tratamento com a finalidade de provocar uma diminuição do título de anticorpos contra os receptores de acetilcolina. Estas medicações devem ser administradas em animais estáveis sem a presença de pneumonia aspirativa. Os medicamentos geralmente utilizados são a prednisona, na dosagem de 0,5 mg/kg ao dia por via oral. Como os corticosteroides podem desencadear, em dosagens imunossupressoras, a piora da fraqueza muscular, recomenda-se que o tratamento seja iniciado com doses baixas e que sejam gradualmente aumentadas dentro de um período de 2 a 4 semanas. O imunomodulador geralmente utilizado é a azatioprina (Imuran®), na dosagem de 2 mg/kg ao dia ou o micofenolato de mofetil (Cellcept®), na dosagem 10 a 20 mg/kg a cada 12 horas, isolada ou associada a prednisona (12,14,20).

A pneumonia aspirativa é a complicação mais comum nos quadros de megaesôfago secundário a miastenia gravis. Nesses casos deve-se proceder com a realização da lavagem transtraqueal e o material obtido deve ser enviado para a cultura e antibiograma. Antibioticoterapia deve ser instituída com o uso de antibióticos de amplo espectro e de administração intravenosa, medicamentos como ampicilina e aminoglicosídeos devem ser evitados por prejudicarem a transmissão neuromuscular. Também devem ser instituídos a fluidoterapia, nebulização e percussão do tórax para auxiliar na excreção de secreções (14).

O prognóstico é desfavorável nos casos associados à pneumonia aspirativa. De modo geral, depende das respostas individuais ao tratamento. O prognóstico tende a ser reservado nos casos em que o animal responde bem ao manejo dietético e ao tratamento instituído para a miastenia gravis, sem apresentação de pneumonia aspirativa, no entanto ainda estão em situação de risco. Há animais que respondem bem ao tratamento por vários anos e outros que não respondem a terapia anticolinesterásica (12,14,15).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dessa revisão de literatura, podemos concluir que a miastenia gravis é uma das principais causas do megaesôfago secundário, sendo assim, deve sempre estar como diagnóstico diferencial nos casos de megaesôfago. Um dos principais sinais clínicos do megaesôfago é a regurgitação e da miastenia gravis é a fraqueza que se intensifica após o exercício e melhora com o repouso. É de extrema importância o diagnóstico precoce desta enfermidade, uma vez que uma das suas complicações é a pneumonia aspirativa. O tratamento se baseia no manejo alimentar, na utilização de anticolinesterásicos, imunossupressores e/ou imunomoduladores e terapia suporte com a administração de inibidores da bomba de prótons e medicamentos pró-cinéticos. O prognóstico é reservado e dependente da resposta individual de cada animal, sendo que, mesmo quando controlado o quadro clínico, ainda há o risco de ocorrência da pneumonia aspirativa, o que agrava o caso. Há casos de remissão total dos sinais clínicos, como também de animais que não respondem a nenhum tratamento imposto.

REFERÊNCIAS

1. German AJ. How i treat megaesophagus. In: Proceedings of the North American Veterinary Conference; 2005; Orlando. Orlando: NAVC; 2005.
2. Scherma MR, Fonseca NC, Palucci SH. Megaesôfago e atrofia muscular da cabeça secundários a miastenia em uma cadela da raça rottweiler: relato de caso. *Ens Cienc Cienc Biol Agrar Saude*. 2008;12(1):197-203.
3. Longshore RC. Megaesôfago. In: Tilley LP, Smith FWK. *Consulta Veterinária em 5 minutos: canina e felina*. 3a ed. São Paulo: Manole; 2008. p.950-1.
4. Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de pequenos animais*. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p.418-9.
5. Celano RMG, Ebram Neto J, Bottoni A, Gagliardi D. Avaliação nutricional pré-operatória dos pacientes com megaesôfago não-avanzado. *Rev Col Bras Cir*. 2007;34(3):25-31.
6. Washabau RJ. Doenças do esôfago. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de medicina veterinária: doenças do cão e do gato*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.1205-14.
7. Andrade SF, Nogueira RMB, Melchert A, Silva MPC, Motta YP, Brinholi RB, et al. Megaesôfago secundário à miastenia gravis em uma cadela da raça Pastor Alemão. *Semina Cienc Agrar*. 2007;28(3):447-82.
8. Torres P. Megaesófago en el perro. Revisión bibliográfica y proposición de una nueva clasificación. *Arch Med Vet*. 1997;29(1):13-23.
9. Tanaka NM, Hoogevonink N, Tucholski AP, Trapp SM, Frehse MS. Megaesôfago em cães. *Rev Acad Cienc Agrar Ambient*. 2010;8(3):271-9.
10. Spillmann T. Esophageal diseases diagnostic and therapeutic approach. In: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association; 2007; Sydney. Sydney: WSAVA; 2007.
11. Machado TV, Brizzotti MM. Miastenia grave em cão. *Rev Caes Gatos*. 2012;57(152):10-7.
12. Schelton D. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002;32(1):189-206.
13. Klein BG, Cunningham JG. A sinapse. In: Cunningham JG, Klein BG. *Tratado de fisiologia veterinária*. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.75-80.
14. Taylor SM. Doenças neuromusculares. In: Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de pequenos animais*. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p.1106-8.
15. Lama MG, Travera FJT. Miastenia gravis adquirida em caninos domésticos. *Vet Mexico*. 2000;31(3):231-8.

16. De Lahunta A, Glass E. Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. 3a ed. St Louis: Elsevier; 2009.
17. Gaynor AR, Shofer FS, Washabau RJ. Risk factors for acquired megaesophagus in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1997;211(11):1406-12.
18. Wray JD, Sparkes AH. Use of radiographic measurements in distinguishing myasthenia gravis from other causes of canine megaesophagus. J Small Anim Pract. 2006;47(5):256-63.
19. Willard MD. Distúrbios da cavidade oral, faringe e esôfago. In: Couto CG, Nelson RW. Medicina interna de pequenos animais. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.398-9.
20. Dewey CW, Cerda-Gonzalez S, Fletcher DJ, Harb-Hauser MF, Levine JM, Badgley BL, et al. Mycophenolate mofetil treatment in dogs with serologically diagnosed acquired myasthenia gravis: 27 cases (1999–2008). J Am Vet Med Assoc. 2010;236(6):664-8.

Recebido em: 18/06/2015

Aceito em: 12/08/2016

ASPECTOS GERAIS SOBRE A MASTITE BOVINA CAUSADA POR *Mycoplasma* spp.

Nathália Brancato Junqueira¹

Hélio Langoni²

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo, e a sua produção é fundamental na economia brasileira. A mastite bovina é a causa de um dos maiores prejuízos na produção leiteira, e a origem desta enfermidade em 90% dos casos está associada a infecções bacterianas, sendo descrito na literatura 137 espécies de micro-organismos, de 35 diferentes gêneros causadores. O *Mycoplasma* spp., tem distribuição mundial e pode causar grave pneumonia em bezerros e mastite em vacas lactantes além de outros processos infecciosos. As mastites causadas por *Mycoplasma* spp. são relativamente comuns em grandes rebanhos leiteiros. Nos Estados Unidos já foi relatado 70% de rebanhos infectados, porém este patógeno ainda é subestimado no Brasil, onde se têm poucos relatos de sua ocorrência como agente causador de mastite, devido provavelmente a quantidade reduzida de laboratórios que incluem a análise de bactérias do gênero *Mycoplasma* em sua rotina. Isto provavelmente ocorre pela necessidade de meios seletivos e de condições especiais para o isolamento deste patógeno.

Palavras-chave: Leite, micoplasmose, bovinos, saúde do úbere.

GENERAL ASPECTS ABOUT BOVINE MASTITIS CAUSED BY *Mycoplasma* spp.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest dairy producers in the world, and its production is essential to Brazilian economy. Bovine mastitis is responsible for the biggest losses in milk production and the origin of this disease in 90% of cases are associated with bacterial infections, being described in the literature 137 species of microorganisms, caused by 35 different genres. *Mycoplasma* spp., has a worldwide distribution and can cause severe pneumonia in calves, mastitis in lactating cows and other infectious processes. The mastitis caused by *Mycoplasma* spp. are relatively common in large dairy herds. In United States it has been reported 70% of herds infected with this pathogen, but this microorganism is still underestimated in Brazil, where we have few reports of its occurrence as mastitis agent cause, this fact occurs probably due to the reduced number of laboratories that includes the analysis of *Mycoplasma* in your routine. This probably happen due to the need of selective media and special conditions for the isolation of this pathogen.

Keywords: Milk, mycoplasmosis, bovine udder health.

¹ Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professor do Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu.

ASPECTOS GENERALES SOBRE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR *Mycoplasma* spp.

RESUMEN

Brasil es uno de los mayores productores de leche en el mundo, y su producción es esencial para la economía brasileña. La mastitis bovina es responsable por las mayores pérdidas en la producción de leche y el origen de esta enfermedad en el 90% de los casos están asociados con infecciones bacterianas, que se describen en la literatura 137 especies de microorganismos, causadas por 35 géneros diferentes. *Mycoplasma* spp., Tiene una distribución mundial y puede causar neumonía grave en terneros, la mastitis en vacas lactantes y otros procesos infecciosos. La mastitis causada por *Mycoplasma* spp. son relativamente comunes en los grandes rebaños lecheros. En Estados Unidos se ha informado de 70% de descuento en los rebaños infectados por este patógeno, pero este microorganismo todavía está subestimado en Brasil, donde tenemos algunos informes de su aparición como agente de la causa de mastitis, este hecho se produce, probablemente debido al reducido número de laboratorios que incluye el análisis de *Mycoplasma* en su rutina. Probablemente esto sucede debido a la necesidad de medios selectivos y condiciones especiales para el aislamiento de este patógeno.

Palabras clave: Leche, micoplasmosis, bovino salud de la ubre.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo ocupando a quinta posição no ranking mundial, com uma produção de 26 mil toneladas de leite fluído no ano de 2015 (1). O país vem apresentando taxas de crescimento populacional e consequente aumento da demanda láctea interna, entretanto a produção atual ainda é insuficiente para suprir o mercado interno.

Estima-se que a produção brasileira de leite relacione-se a 22.000.000 de vacas, em sua maioria mestiças, não especializadas, de propriedade de pequenos produtores, caracterizando-se com uma baixa produtividade de 1.340 litros/vaca/ano, com baixa qualidade do produto final (2). Vários aspectos devem ser considerados com relação a produção e produtividade leiteira, como por exemplo a genética dos animais, a nutrição, e muito importante o manejo higiênico-sanitário animal estabelecido na propriedade, principalmente no que se refere à qualidade do leite e controle das mastites (3).

Além da produção do leite ser fundamental na economia brasileira, devido a sua importante geração de renda e emprego no campo, ele também é considerado um produto essencial para a população, por ser um alimento de alto valor nutritivo e essencial em todas as fases da vida humana (2). Portanto ressalta-se a necessidade deste alimento exercer sua função nutricional de forma segura, ou seja, com ausência de patógenos que apresentem risco a saúde dos consumidores e que mantenham as suas características organolépticas (4).

A mastite bovina é a causa de um dos maiores prejuízos na produção leiteira, que pode se dar tanto pela queda na produção láctea, perda da qualidade do leite e até perda da função de quartos mamários infectados (5). Esta enfermidade tem por características um processo inflamatório da glândula mamária relacionadas a agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas. (6).

A origem deste processo inflamatório, segundo Philpot e Nickerson (7) em 90% de seus casos está associada a infecções bacterianas, e de múltipla etiologia (8), portanto além das perdas econômicas na qualidade e produção de leite, também deve-se enfatizar os riscos à saúde pública decorrentes das mastites, devido a presença de agentes patogênicos que podem

ser fatores de risco para humanos em decorrência da eliminação dos próprios patógenos ou de suas toxinas no leite (9,10).

A mastite pode ser caracterizada de duas formas. A mastite clínica, na qual os sinais da doença são evidentes, úbere com edema, hipertermia, rubor, sensibilidade à palpação, apresentando alterações no leite, como pus e/ou grumos (11). E a mastite subclínica, na qual não se observa alterações macroscópicas no leite ou sinais de inflamação da glândula mamária, porém observam-se alterações na composição físico-química do leite, além de queda na produção dos animais acometidos, bem como o aumento da contagem de células somáticas (CCS) (12).

No Brasil, a mastite subclínica é de extrema importância econômica, devido sua alta incidência variável de 44,88% a 97,0%, e queda na produção de leite de 25,4% a 43,0% (13). Comparando-se a produção de tetos positivos com seus homólogos negativos para vários patógenos em casos subclínicos de mastites, encontraram perdas na produção leiteira de 25,2% para *Streptococcus agalactiae*, 22,6% para *Staphylococcus aureus*, 19,1% para *Staphylococcus epidermidis* e 23,5% para *Corynebacterium bovis* (14).

A etiologia da mastite é complexa e multivariada, já tendo sido descrita na literatura 137 espécies de micro-organismos, de 35 diferentes gêneros causadores (15). Desta maneira faz-se necessária a identificação do micro-organismo causador da patologia para um efetivo controle. Destaca-se portanto, a importância do exame microbiológico com a utilização de meios de cultura especiais e em condições adequadas de incubação para que se possa melhorar a sensibilidade do diagnóstico microbiológico, evitando-se resultados falso negativos.

Os principais agentes contagiosos, a nível mundial, de mastite bovina são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (8,16). *Mycoplasma* spp., tem distribuição mundial e pode causar grave pneumonia em bezerros, mastite em vacas lactantes e poliartrites (17). Já foi associado a ceratoconjuntivite (18), endometrites, salpingites, otites, aborto e seminovesiculite, nas quais todas foram reproduzidas experimentalmente (19).

MASTITES POR *Mycoplasma* spp.

As mastites causadas pelos patógenos do gênero *Mycoplasma* spp. são relativamente comuns em grandes rebanhos leiteiros (20), entretanto, este patógeno ainda é subestimado (21), principalmente no Brasil, onde se têm poucos relatos de sua ocorrência como agentes causadores de mastites. Sabe-se entretanto, que poucos são os laboratórios especializados e preparados para o seu diagnóstico, considerando condições de isolamento que exige atmosfera de CO₂, meios de cultura específicos e período para o isolamento de no mínimo 5 dias. Deve-se considerar ainda as características das colônias que são diminutas, havendo a necessidade de lupa para caracterização fenotípicas das colônias.

Apesar de várias espécies de *Mycoplasma* spp. já terem sido isoladas em casos de surtos de mastite bovina, *Mycoplasma bovis* é o patógeno de maior importância (20), ou seja, com maior patogenicidade, causando maior incidência de infecções nos rebanhos, considerando-se uma alta contagiosidade (22). Pode causar mastites clínicas, subclínicas ou crônicas e apesar de ser considerado um patógeno contagioso, a evolução da afecção se assemelha ao padrão de patógenos ambientais, com surtos de casos clínicos da doença (23). Uma vez que a mastite por *Mycoplasma* se estabelece, o animal afetado pode eliminar de 10⁶ a 10⁸ UFC por mL de leite, contaminando assim a ordenhadeira, as mãos do ordenhador e outras fômites, que se tornam importantes vias de transmissão para outros animais do rebanho (20).

Os sinais clínicos da mastite causada pelo *Mycoplasma bovis* incluem queda abrupta na produção de leite, mais de um quarto apresenta mastite, e aumento de casos que não respondem a terapêutica. Clinicamente os animais se apresentam saudáveis apesar da mastite

severa. O leite apresenta sedimento, semelhante a areia (24). Por sua vez, alguns sinais clínicos atípicos podem surgir nesta enfermidade, incluindo claudicação, edema das porções dos membros anteriores e poliartrites (25).

A introdução do *M. bovis* em rebanhos livres da infecção, se dá pela entrada de bezerras ou novilhas clinicamente saudáveis na propriedade, que são portadoras sãs do *Mycoplasma bovis* e uma vez introduzido o patógeno, em qualquer fase da vida dos animais, torna-se difícil a sua erradicação (26). Desta forma recomenda-se a avaliação clínica e microbiológica previamente a introdução de novos animais no rebanho, a partir da utilização de quarentena na propriedade.

Os bezerros podem manter o *M. bovis* em seu trato respiratório, por vários meses ou até anos, servindo como reservatório do patógeno (27). A disseminação deste agente no organismo do animal, na maioria das vezes, é via descendente, ou seja, afeta primeiramente o pulmão ou outros órgãos e posteriormente, via sanguínea alcança a glândula mamária (28).

O contato entre animais, por meio das vias respiratórias, canal dos tetos, trato genital, incluindo até inseminação artificial com sêmen contaminado são também vias de transmissão (27). Outra maneira da introdução acidental do patógeno em um rebanho, é por meio de fômites, como cânulas e seringas contaminadas, via intramamária (20).

Para o controle das mastites por *M. bovis* é necessário a detecção de animais infectados e a eliminação dos mesmos. Simultaneamente deve-se priorizar medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antiséptica após a ordenha, desinfecção e manutenção adequada do equipamento de ordenha (29). Vale aqui também o conceito e a adoção de um programa de controle rigoroso na prevenção das mastites (30)

As perdas econômicas registradas nos EUA, por mastites causadas pelo *Mycoplasma bovis*, são estimadas em até \$108 milhões de dólares por ano com níveis de até 70% dos rebanhos infectados (31). Porém, em muitos países, é um patógeno subestimado, devido a quantidade reduzida de laboratórios que inclui a análise de *M. bovis* em sua rotina (21), considerando-se principalmente a necessidade de meios seletivos e de condições especiais para o seu isolamento.

O primeiro representante do gênero *Mycoplasma* spp. foi identificado em 1890, como *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides*, causador da pleuropneumonia contagiosa bovina, e subsequentemente os tipos semelhantes de micoplasmas foram chamados de micro-organismos semelhantes aos da pleuropneumonia (PPLo) (20). A partir de um surto de mastite bovina, em 1961, *Mycoplasma bovis* foi isolado pela primeira vez, nos Estados Unidos (32), tendo sido inicialmente diagnosticado como *Mycoplasma bovimastitidis*. Apenas em 1976, após diversos estudos baseados em técnicas moleculares, deu-se então a classificação de *Mycoplasma bovis* (33).

A partir de então, devido ao grande trânsito de animais (21), o *Mycoplasma bovis* tem sido descrito em diversos países, como Israel (1964), Espanha (1967), Austrália (1970), França (1974), Inglaterra (1975), Checoslováquia (1975), Alemanha (1977), Dinamarca (1981), Suíça (1983), Marrocos (1988), Coreia do Sul (1989), Irlanda do Norte (1993), República da Irlanda (1994), Chile (2000) (21), Grécia (34), Bósnia Herzegovina (35), Itália (36) e Japão (2000) (37).

No Brasil, a primeira citação de casos de mastite por esse patógeno foi de Mettifogo et al. (38), na região de Londrina-PR, evidenciando a importância deste patógeno na etiologia da mastite. Pretto et al. (24), também contribuíram para o levantamento deste micro-organismo na região norte do Paraná e sudoeste do Estado de São Paulo, trabalhando com 713 animais provenientes de três propriedades leiteiras, entre as quais de 137 que apresentavam mastite, oito eram causadas por *Mycoplasma bovis*, correspondente a 5,83% dos casos.

Trabalhando com amostras de tanque de expansão de cinco propriedades do centro-oeste paulista, Langoni et al. (39) obtiveram por PCR positividade para o gênero *Mycoplasma*

spp. em amostras de leite de uma propriedade pela reação em cadeia polimerase PCR. Por outro lado, Manzi et al., (40) avaliando a prevalência de *Mycoplasma* spp. no leite de tanques de expansão em 68 propriedades na região de Botucatu, São Paulo, coletando três amostras de leite em períodos diferentes de cada propriedade, totalizando 204 amostras de leite, obtiveram 12 amostras de leite positivos pela PCR para *Mycoplasma* spp. sendo que destes uma foi positiva para *Mycoplasma bovis*. Os autores concluem pela importância de se incluir o diagnóstico deste grupo de patógenos no diagnóstico das mastites, subclínicas e clínicas, para melhor avaliação do seu papel nas infecções intramamárias.

A literatura relata prevalência de 0,5 a 35% de mastite causada por *Mycoplasma bovis* em diversos países (41). Porém devido às necessidades especiais requeridas para a cultura e isolamento de *Mycoplasma*, no Brasil, a pesquisa desse agente, tanto nas mastites como em outras patologias dos sistemas respiratório, urogenital, articular, sistema nervoso e conjuntiva ocular são pouco frequentes (42), e há uma necessidade de incrementá-los para se conhecer melhor os aspectos de etiopatogenia desse grupo de micro-organismos de suma importância em Medicina Veterinária.

Os micoplasmas pertencem a classe *Mollicutes*, gênero *Mycoplasma*, tais micro-organismos se diferem de outras bactérias pela ausência de parede celular rígida, são células delimitadas apenas pela unidade trilaminar da membrana (17). Sendo assim, são considerados altamente pleomórficos, e capazes de produzir filamentos que parecem fungos, daí o seu nome (*mykes* = fungo e *plasma* = formato) (43).

As células do gênero *Mycoplasma* são pequenas, variando de 0,1 a 0,25µm, com um volume celular que representa em torno de 5% do volume de um bacilo típico. Devido ao seu tamanho e plasticidade sua passagem é possível por meio dos filtros que retêm bactérias comuns, sendo assim estes organismos foram inicialmente considerados como vírus (43).

A ausência de parede celular bacteriana típica, contendo peptidoglicano, torna estes micro-organismos insensíveis aos agentes antimicrobianos contra parede celular, como as penicilinas e cefalosporinas, podendo implicar em perdas econômicas caso não seja feito um diagnóstico adequado. Todavia, são suscetíveis à dessecação, ao aquecimento, a detergentes e desinfetantes (17).

Os *Mycoplasmas* podem representar os menores organismos autoreplicáveis capazes de sobreviver como células livres (43). Em virtude do seu “QI” genético mais baixo, esses micro-organismos possuem uma capacidade limitada de realizar biossíntese, portanto o cultivo de micoplasmas exige meios enriquecidos contendo precursores desta biossíntese (17). Em sua maioria são anaeróbios facultativos, sendo que alguns crescem otimamente em uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂, (17) e suas colônias têm menos de 1 mm de diâmetro e uma aparência característica de “ovo frito” quando vistas sob luz transmitida com auxílio de lupas (43).

Portanto, como alternativa aos métodos convencionais de detecção de *Mycoplasma*, existe a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é acurado e amplamente aceito como um método confiável para detecção de *Mycoplasma* spp. em amostras de leite (44-47). Permitindo assim um rápido diagnóstico, e prevenção de possíveis surtos de mastites causadas por esse agente. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da PCR para a detecção *Mycoplasma* spp. (48).

Além da PCR tradicional, segundo Justice-Allen e colaboradores (49), outra ferramenta que pode ser utilizada é a PCR em tempo real. Esta técnica facilita a identificação de *Mycoplasma bovis*, auxilia na identificação de outras espécies de micoplasmas e identifica coinfeções por diferentes espécies de micoplasmas em uma mesma amostra, pela análise de temperatura de dissociação. Além desse aspecto essa técnica permite avaliar a carga bacteriana presente na amostra de leite examinada.

Para se realizar uma cultura e isolamento de micoplasmas são necessários meios e tempo de incubação especiais, além de condições de microaerofilia. Tendo em vista a

frequência de amostras de leite de vaca com alterações sugestivas de mastite, clínica ou subclínica, apresentarem-se negativas a sucessivas culturas realizadas a partir de métodos microbiológicos padrões, pode-se suspeitar de um subdiagnóstico de mastite por *Mycoplasma* (50). Novos estudos são importantes para que se possa avaliar realmente o papel dos micoplasmas enquanto patógeno especialmente nas mastites.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite causada por *Mycoplasma* spp. já é relatada pela literatura por sua fundamental importância econômica em diversos países, porém ela ainda é subestimada no Brasil devido a falta de estudos relacionado a esta temática. Devido a alta contagiosidade do patógeno e aos diversos problemas que ele pode causar em uma propriedade, como doenças respiratórias, reprodutivas, poliartrites, entre outras, é de grande valia o aprofundamento da micoplasmologia na etiologia das mastites no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service, 2016. Dairy: World Markets and Trad; 2016 [cited 2016 July 14]. Available from: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>
2. Zoccal R, Gomes AT. Zoneamento da produção de leite no Brasil. In: Anais do XIII Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural; 2005; Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural; 2005.
3. Domingues PF, Langoni H. Manejo sanitário animal. 1a ed. Rio de Janeiro: Epub; 2001.
4. Fonseca MI. Influência do processo de ordenha manual na qualidade do leite cru produzido em propriedade rural familiar. Vet Zootec. 2013;20:393-4.
5. Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf Junior W, Gomes JF, et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Rev Bras Agrocienc. 2003;9:287-90.
6. Tozzetti DS, Bataier MBN, Almeida LRD, Piccinin A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. Rev Cient Eletronica Med Vet. 2008;6:1-7.
7. Philpot WN, Nickerson SC. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros; 2001.
8. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF, Silva AV. Aspectos etiológicos na mastite bovina. Rev Bras Med Vet. 1998;20:204-10.
9. Costa EO. Importância da mastite na produção leiteira do país. Rev Educ Contin CRMV-SP. 1998;1:3-9.
10. Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-pereira VB, Marson PM, Pantoja JCF, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J Dairy Sci. 2013;96:2866-72.

11. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastites. São Paulo: Lemos editorial; 2000.
12. Cullor JS, Tyler JW, Smith BP. Distúrbios da glândula mamária. In: Smith BP. Tratado de medicina interna dos grandes animais. São Paulo: Manole; 1994. p.1041-60.
13. Brant MC, Figueiredo JB. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. Arq Bras Med Vet Zootec. 1994;46:595-606.
14. Domingues PF, Langoni H, Padovani CR. Influência da mastite bovina subclínica sob a produção de leite. Vet Zootec. 1998;10:99-106.
15. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol. 1998;16:41-66.
16. Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. Guidelines for monitoring bulk tank somatic cell and bacterial counts. J Dairy Sci. 2004;87:3561-73.
17. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Micoplasmas. In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.193-9.
18. Kirby FD, Nicholas RA. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. Vet Rec. 1996;138:552.
19. Ruhnke HL. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. Mycoplasmosis in animals. Ames: Iowa State University Press; 1994. p.56-61.
20. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Causas bacterianas de mastite bovina. In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.451-60.
21. Nicholas RAJ, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Res Vet Sci. 2003;74:105-12.
22. Bushnell RB. *Mycoplasma mastitis*. Symposium on mastitis. Vet Clin North Am Large Anim Pract. 1984;6:301-12.
23. Bramley J. Identifying mastitis problems and strategies for control. In: Proceedings of the 31st National Mastitis Council; 1992; Arlington. Arlington: National Mastitis Council; 1992. p.5-14.
24. Pretto LG, Muller EE, Freitas JC, Mettifogo E, Buzihani M, Yamaguti M, et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. Pesqui Vet Bras. 2001;21:143-5.
25. Wilson DJ, Skirpstunas RT, Trujillo JD, Cavender KB, Bagley CV, Harding RL. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. J Am Vet Med Assoc. 2007;230:1519-23.

26. Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet Rec.* 1989;124:420-2.
27. Pfutzner H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt Bakteriologie.* 1990; Suppl 20:394-9.
28. Fox LK, Kirk JH, Britten A. *Mycoplasma* mastitis: a review of transmission and control. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005;52:153-60.
29. Gunning RF, Shepherd PA. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet Rec.* 1996;139:23-4.
30. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:620-6.
31. Rosengarten R, Citti C. The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics.* Brussels: European Commission; 1999. p.14-7.
32. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 1962;52:582-91.
33. Askaa G, Ernø H. Evaluation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26:323-5.
34. Filioussis G, Christodouloupoulos G, Thatcher A, Petridou V, Bourtzi-Chatzopoulou E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *Vet J.* 2007;173:215-8.
35. Rifatbegovic M, Assunção P, Poveda JB, Pasic S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. *Vet Rec.* 2007;160:484-5.
36. Radaelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanziani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci.* 2008;85:282-90.
37. Maeda T, Shibahara T, Kimura K, Wada Y, Sato K, Imada Y, et al. *Mycoplasma bovis* - associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J Comp Pathol.* 2003;129:100-10.
38. Mettifogo E, Nascimento ER, Müller EE, Nascimento MGF, Freitas JC. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Rev Bras Med Vet.* 1996;18:22-5.
39. Langoni H, Fernandes SJ, Manzi MP. Qualidade do leite: pesquisa de *Mycoplasma* spp. em tanques de expansão pela reação em cadeia da polimerase – PCR. *Vet Zootec.* 2013;20:32-3.
40. Manzi MP, Langoni H, Joaquim SF. Prevalência de *Mycoplasma* spp. em leite de tanques de expansão da região de Botucatu-SP. *Vet Zootec.* 2013;20:384-5.

41. González RN, Wilson DJ. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19:199-221.
42. Buzinhani M, Metiffogo E, Timenetsky J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59:1368-75.
43. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Procariotos: domínios bacteria e archaea. In: *Microbiologia.* Porto Alegre: Artmed; 2012. p.319-20.
44. Ghadersohi A, Coelen RJ, Hirst RG. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol.* 1997;56:87-98.
45. Baird SC, Carman J, Dinsmore RP, Walker RL, Collins JK. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 1999;11:432-5.
46. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2584-9.
47. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. *J Microbiol.* 2006;44:42-9.
48. Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, Florio da Cunha RA. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet Microbiol.* 2000;72:241-50.
49. Justice-Allen A, Trujillo J, Goodell G, Wilson D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. *J Dairy Sci.* 2011;94:3411-9.
50. Philpot WN, Nickerson SC. *Vencendo a luta contra a mastite.* São Paulo: Milkbuzz; 2002.

Recebido em: 10/03/2016

Aceito em: 08/08/2016

REMAINING OF THE YOLK SAC

Gabriela Amorim Campos^{1*}
Victor Filgueiras Cruz Garcia¹
Milena da Silva Machado²
Viciany Erique Fabris³
Maria Jaqueline Mamprim¹
Nereu Carlos Prestes¹

ABSTRACT

It was described the occurrence of yolk sac remnant with macroscopic, radiographic, ultrasonographic, tomographic and histologic evaluation of the material obtained from the placenta of a Thoroughbred mare after delivery of a viable foal.

Keywords: Parturition, mare, obstetrics.

SACO VITELÍNICO REMANESCENTE

RESUMO

Ocorrência de remanescente de saco vitelínico descrito por avaliação macroscópica, radiográfica, ultrassonográfica, tomográfica e histológica do material obtido da placenta de uma égua Puro Sangue Inglês após o parto de um potro viável.

Palavras-chave: Parto, égua, obstetrícia.

REMANENTE DE SACO VITELINO

RESUMEN

Ocurrencia de un remanente de saco vitelino descrito por evaluación macroscópica, radiográfica, ecográfica, tomografía computarizada y histológica del material obtenido de la placenta de una yegua Puro Sangre después del nacimiento del potro viable.

Palabras clave: Parto, yegua, obstetricia.

INTRODUCTION

The yolk sac originates from endodermic tissue emanating from the inner cell mass covering the internal trophoectoderm layer. It develops from the blastocoele and almost disappears after a few weeks, except in horses, that present persistent yolk sac, being observed up to 60 days of gestation (1,2).

In horses, the yolk sac is the dominant structure in the first three to four weeks of gestation, comprising the majority of the total embryo weight (1). Thereafter, the cavity of the yolk sac and the allantoic sac occupy the same space, and about after 60 days, the yolk sac undergoes atresia, becoming a linear bag contained within the distal umbilical cord (3,4).

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology. FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Corresponding autor: Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu, SP, Brasil, 18.618-970. gabrielaamorim@msn.com

² Beverly Hills Farm, Avaré, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology. FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo, Brazil.

Occasionally, large ossified hollow structures remnants of the yolk sac are found in the horse placenta. These structures are connected by a stalk segment to the allantoic cord (3). This structure generally has cystic shape and variable size and consistency (5). It is usually filled with fluid and for unknown reasons develops small areas of bone metaplasia in its central segment, or several bony plates on the wall (6,7). On rare occasions, these structures can compromise blood flow of the umbilical vessels and result in miscarriage (3,7).

CASE REPORT

//During the breeding season in a Thoroughbred race Haras, in the region of Avare (Latitude 23 05' 55" S, Longitude 48 55' 33" W), São Paulo, in the routinely pregnancy diagnosis evaluation, it was identified that one of the mares, 5 years old and weighing 620 kg, had an initial twin pregnancy, with three vesicles. It was decided to perform the destruction of two vesicles and follow through with the pregnancy of one, in order not to delay pregnancy and to prevent future complications.

The procedure was successfully performed using ultrasound to guide the identification of the vesicles to be eliminated. Gynecological exams were performed routinely throughout the gestation.

At parturition, the mare needed aid for delivery, requiring traction of the foal. After the obstetric procedure, it was noted next to the fetal membranes a circular mass of firm consistency and cystic areas (Figure 1A and 1B). The mass was collected, wrapped, stored at -20°C, and then sent to the Animal Reproduction Division, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu-SP.

At the Veterinary Hospital, ultrasound, radiography and computerized tomography examinations were performed. Then, the material was immersed in 70% alcohol and after 2 days, it was transferred to formaldehyde for histological evaluations.

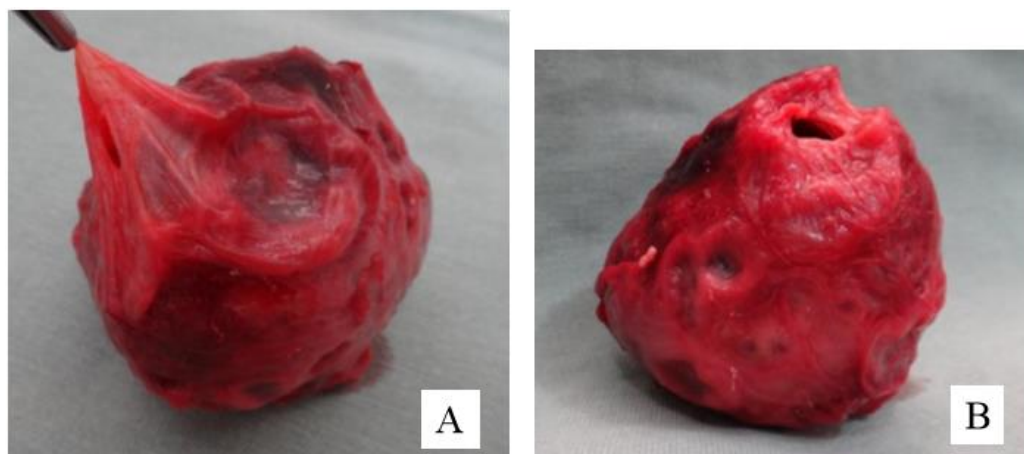


Figure 1. (A) and (B) Yolk sac remnant.

MACROSCOPIC EXAMINATION

The tissue weighed 91 g, measuring 7.5 x 6.0 x 6.0 cm, with a serous and mucous content in their cystic cavities, which ranged from 1.0 to 4.0 cm in diameter. On palpation, it was noted a firm consistency, that when pattering, it made a hollow sound. At cut, there were numerous cystic formations of various sizes, some with serous or mucoid tissue and others with a brown content. All structures were permeated by hard tissue, calcified, which produces the hollow sound reported above (Figure 2).



Figure 2. Yolk sac remnant cut in half. It can be seen cystic formations surrounded by ossified tissue.

RADIOGRAPHY

At the X-ray, it was observed a circumscribed structure with radiopaque borders, measuring 6.83cm x 6.03cm in their major axes, showing internal septa and trabeculae of bone radiopacity, with areas of cavities filled with gas content (Figure 3A).

ULTRASOUND EXAMINATION

At the ultrasound examination an irregular surface structure was revealed, with wraps and hyperechoic septa forming some areas of posterior acoustic shadowing artifact. There were also cavity areas filled with hypoechoic fluid content and discrete hyperechoic dots in suspension and other cavity areas filled with reverberation forming content (Figure 3B).

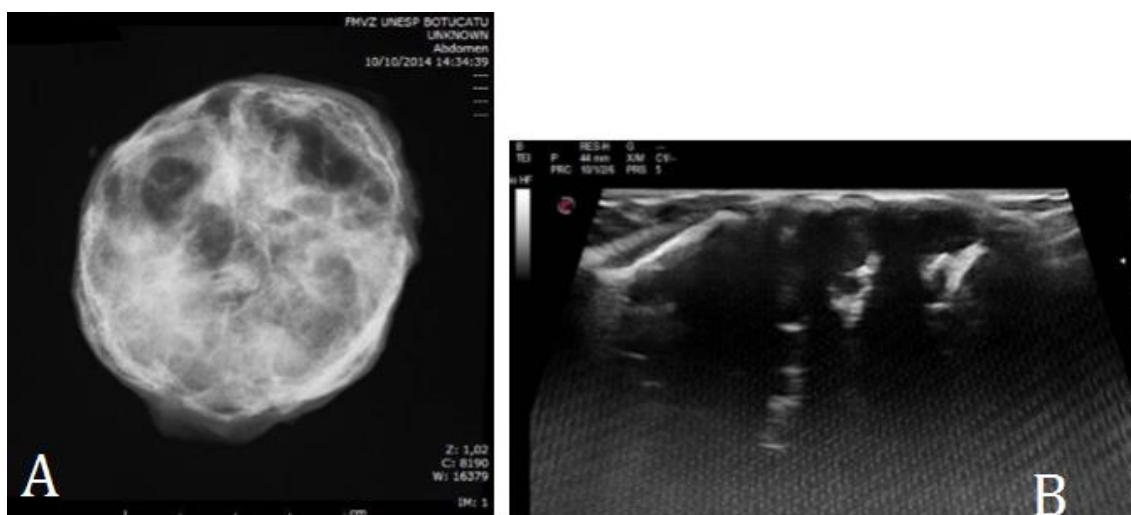


Figure 3. (A) X-ray of an ossified remaining of the yolk. (B) Ultrasound exam where it is observed uneven surface, cavities filled by hypoechoic fluid content.

CT SCAN

The computerized tomography performed in axial projection with 1mm increment cuts without contrast injection also has identified cavity areas filled by material with density ~ -1.000HU and ~ -2 to 50HU and presence of irregular septa with high density ~ 200HU forming the various cavity areas. After fixation in 38% formaldehyde, the CT images showed that the size was 6.89 x 6.39 x 6.09 cm in their largest axis (Figure 4).

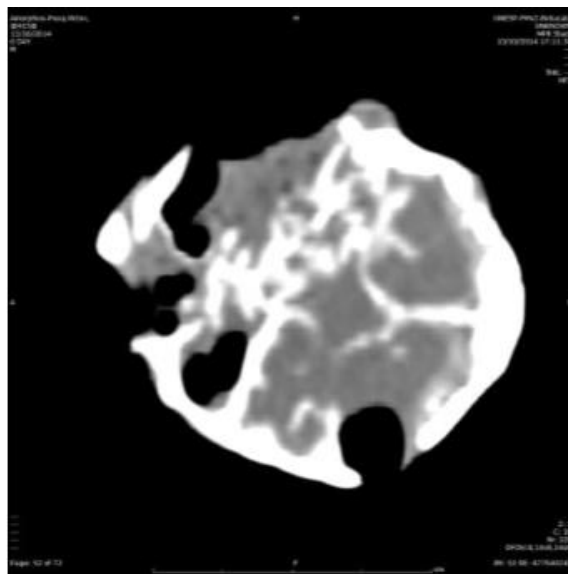


Figure 4. CT scan of the yolk sac remnant.

HISTOPATHOLOGY

Cysts filled with sero-mucous material were observed with red blood cells, uncoated walls and with a basophilic matrix, where in most of them there was mineralization (Figure 5A). It can be observed a mineralized uncoated cystic wall (Figure 5B and 5C). The mineralization is done in mucinous substrate, where there are areas of calcification and ossification.

It is concluded that the material described above is a "cyst" of the umbilical cord: Remnant of the yolk sac, mineralized (calcified / ossified).

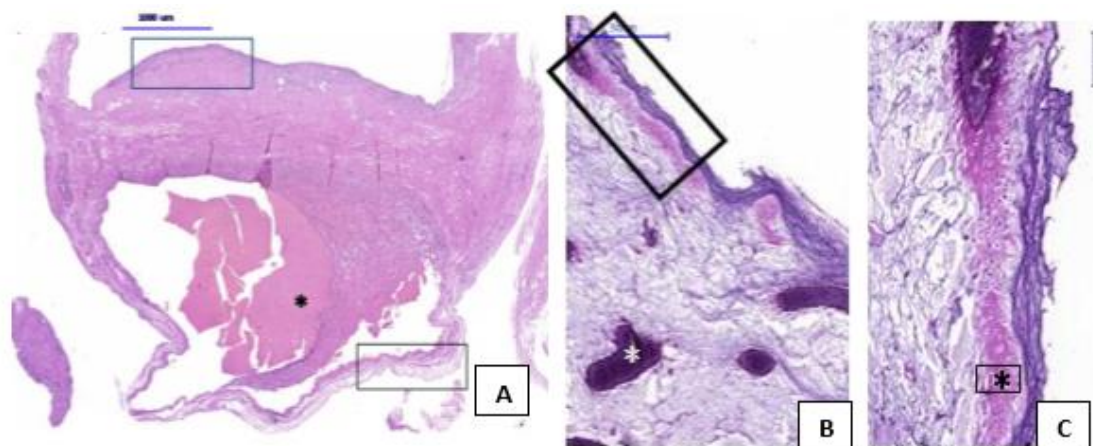


Figure 5. (A) "Cysts" filled with sero-mucous material with red blood cells (*), walls without superficial coating and with a basophilic mucinous matrix (details) (HE). (B) Mineralized cystic wall without epithelial lining. Mineralization in mucinous substrate, where there were calcification (*) and ossification (HE without decalcification). (C) Detail of the previous figure, in which there is calcification in basophilic and bone formation in continuity, overlying a mucoid mucinous matrix (HE).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The macroscopic aspects found in this case are similar to those reported cited by (3,5,6,7). In the histology slide a mineralized cystic wall was observed. Similar data were

presented by (3,5). Different from King (6), these cysts were filled with sero-mucous material with the presence of red blood cells. The radiographic features found in this report corroborate the findings of Cassar et al. (3).

The ossification of the involuted yolk sac tissue is quite common and provides evidence that larger ossified remnants of yolk sac probably begin as small areas of metaplastic formation of trabecular bone that gradually expand on a highly organized manner to form the lamellar wall commonly found in larger "ossified" yolk sac tissues (3).

This seems to be the first study to report data on ultrasound and computerized tomography of which was confirmed to be a yolk sac remaining calcified.

REFERENCES

1. Sharp DC. The early fetal life of the equine conceptus. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:679-89.
2. Landim-Alvarenga FC. Reconhecimento materno do concepto e início da placentação. In: Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia veterinária.* 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.22-40.
3. Cassar TIY, Fallon LH, Martinez EH, Schlafer DH. Segmental ossification of involuted yolk sacs in equine umbilical cords. *Anim Reprod Sci.* 2006;94:439 -42.
4. Morresey PR. The placenta. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2011. p.84-95.
5. Sartori Filho R, Prestes NC, Coelho KIF. Yolk sac remnant in a mini-pony foal. *Equine Pract.* 1997;19:24-6.
6. King JM. Yolk sac remnant. *Vet Med.* 1994;89:27-8.
7. Schlafer DH. Examination of the placenta. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2011. p.99-110.

Recebido em: 15/05/2015

Aceito em: 27/04/2016

EPITELIOGÊNESE IMPERFEITA EM SUÍNOS - RELATO DE CASOLuara Medianeira de Lima Schlösser^{1*}Carlos Augusto Rigon Rossi²Marcelo Soares²Matheus Schardong Lucca³Mauricio da Cruz Franco³Magali Fernandes de Oliveira³Vagner Luis Ferrari Martins¹**RESUMO**

A epiteliogênese imperfeita é caracterizada pela incompleta formação epitelial decorrente de falhas germinativas no ectoderma e mesoderma durante o período embrionário. A doença varia em gravidade e foi descrita na maior parte das espécies domésticas. Em algumas espécies, resulta de mutações geneticamente herdadas, mas a hereditariedade não foi comprovada em outras. Neste trabalho, é abordado um caso de epiteliogênese imperfeita em um suíno macho com aproximadamente 21 dias de idade, atendido na Medicina e Reprodução de Suínos da Universidade Federal de Santa Maria. De acordo com as informações do proprietário, o animal nasceu com malformação da pele em aproximadamente 40% da região dorsal posterior. O tratamento foi instituído a base de um antisséptico para evitar proliferação de patógenos nas secreções, óleo mineral para a hidratação da pele, além de um epitelizante e cicatrizante. Como esta condição é esporádica e afeta alguns animais dentro de uma ninhada, tentativas de prevenção da doença pela eliminação do plantel de animais se torna inviável. Contudo, a prole com este tipo de alteração cutânea, e que sobrevivem, não devem ser mantidos como futuros reprodutores.

Palavras-chave: aplasia cutânea, leitão, malformação da pele.

EPITHELIOGENESIS IMPERFECTA IN THE SWINE- CASE REPORT**ABSTRACT**

Epitheliogenesis imperfecta is characterized by incomplete formation derived epithelial germ ectoderm and mesoderm failures during the embryonic period. The disease varies in severity and was described in most domestic species. In some species, the result of genetically inherited mutations, but heredity was not confirmed in others. In this work, we addressed a case of epitheliogenesis imperfecta in a male pig with approximately 21 days of age, served in Medicine and Reproduction of Swine, Federal University of Santa Maria. According to information from the owner, the animal was born with malformation of the skin in approximately 40% of the posterior dorsal region. The treatment was the basis of an antiseptic to prevent proliferation of pathogens in secretions, mineral oil for moisturizing the skin, plus an epitelizante and healing. Since this condition is sporadic and affects some animals within a litter, attempts to prevent the disease by eliminating the breeding of animals is not feasible.

¹ Programa de Graduação em Medicina Veterinária, UFSM - Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi - 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. luaraschlösser@hotmail.com. *Autor para correspondência.

² Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

³ Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

However, offspring with this type of skin disorder, and survive, should not be kept as future breeders.

Keywords: aplasia cutis, malformation skin, piglet.

EPITELIOGENESE DEFECTUOSO EN CERDOS- RELATO DEL CASO

RESUMEN

Epiteliogênese imperfecta se caracteriza por la formación epitelial incompleta debido al ectodermo germen y mesodermo durante el período embrionario. La enfermedad varía en gravedad, y se describe en la mayoría de las especies domésticas. En algunas especies, el resultado de mutaciones heredadas genéticamente, pero la herencia no ha sido probado en otros. En este trabajo, vamos a abordar un caso de epiteliogênese imperfecta en un cerdo macho con aproximadamente 21 días de edad, se reunió en Medicina y porcina Reproducción de la Universidad Federal de Santa Maria. De acuerdo a la información del propietario, el animal nació con una malformación de la piel en aproximadamente 40% de la superficie dorsal posterior. El tratamiento fue la base de un antiséptico para prevenir la proliferación de patógenos en las secreciones, aceite mineral para la hidratación de la piel, además de un epitelizante y la curación. Dado que esta condición es esporádica y afecta a algunos animales de una misma camada, los intentos de prevenir la enfermedad a través de animales de cría eliminación no es factible. Sin embargo, la descendencia con este tipo de trastorno de la piel, y sobreviven, no debe ser mantenido como criadores futuras.

Palabras clave: Piel aplasia, cerdito, malformación de la piel.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão em extensão dos mamíferos e apresenta funções de proteção, regulação térmica e reserva de nutrientes. É composta por uma camada superficial (epiderme) e uma camada de tecido conjuntivo abaixo da epiderme (derme) (1).

A epiteliogênese imperfeita é caracterizada pela incompleta formação epitelial decorrente de falhas germinativas no ectoderma e mesoderma durante o período embrionário. A doença varia em gravidade e foi descrita na maior parte das espécies domésticas. Em algumas espécies, resulta de mutações geneticamente herdadas, mas a hereditariedade não foi comprovada em outras. Não há informações adicionais a respeito da patogenia. Sem a cobertura protetora (epitélio estratificado escamoso), o tecido subjacente é facilmente agredido e sujeito as infecções (1). Sua ocorrência é menor que 0,01%, visto que os fatores influenciáveis não são claramente descritos (2).

As lesões macroscópicas consistem em áreas bem demarcadas, desprovidas de epiderme e anexos ou mucosa, expondo a derme ou submucosa vermelha e úmida (1). As lesões são descritas principalmente no tronco, mas também em extremidades distais (2). As lesões pequenas podem cicatrizar como escaras e não interferem na sobrevivência do animal. Os animais que nascem com lesões extensas normalmente morrem de infecção ou desidratação e anormalidades eletrolíticas decorrentes da perda excessiva de fluídos pelas das superfícies não epitelizadas (1).

Devido à escassez de dados sobre essas alterações em suínos criados no Brasil e no intuito de auxiliar na sua identificação e controle, esse trabalho descreve os aspectos clínico-patológicos de um suíno com epiteliogênese imperfeita atendido na Medicina e Reprodução de Suínos da Universidade Federal de Santa Maria.

RELATO DE CASO

Foi encaminhado a Medicina e Reprodução de Suínos da Universidade Federal de Santa Maria, um suíno macho inteiro com 21 dias de idade, proveniente de uma propriedade do município de Nova Palma. O animal apresentava malformação de pele em aproximadamente 40% da região dorsal posterior do corpo. Eram áreas desprovidas de epiderme, porção superficial da derme e anexos. Apresentava vasos sanguíneos superficiais congestionados e hemorragias leves. Foi observado também leve infiltrado inflamatório crônico, porém, a cultura bacteriana foi negativa nas amostras de líquido apresentado para bacteriologia. Foram observadas alterações na junção entre a pele íntegra e a afetada. As lesões eram multifocal destacadas do tecido subjacente, formando uma fenda com detritos celulares, de origem vegetal e as células inflamatórias (Figura 1A).



Figura 1. A) Lesões multifocalmente destacadas do tecido subjacente, formando uma fenda com detritos celulares, de origem vegetal e células inflamatórias. B) Completa epiteliação da pele.

O tratamento foi instituído a base de um antisséptico (clorexidina 0,5%) para realizar a limpeza e evitar proliferação de patógenos nas secreções, óleo mineral para a hidratação da pele, além de um epitelizante e cicatrizante -100g do produto: sulfanilamida (5g), ureia (4g), cera de abelha (15g), excipiente qsp 77g - adicionado 1% de óleo mineral. Foram realizadas aplicações diárias durante 60 dias. Este procedimento foi realizado até a completa epiteliação da pele (Figura 1B).

DISCUSSÃO

A epiteliogênese imperfeita, refere-se a mal formação do epitélio. O termo abrange também a epidermólise bolhosa (*Epidermolysis bullosa*) em medicina veterinária. O termo aplasia congênita da cutis é utilizado em medicina humana para descrever lesões semelhantes às observadas em leitões. Em seres humanos, estes defeitos podem ser observados no couro cabeludo, bem como em outros locais do corpo caracterizando defeitos neuroectodérmicos (3). Em nosso estudo podemos observar que uma parte da derme também estava ausente, sugerindo que, a mesoderme embrionária também foi envolvida, ou que parte da derme pode ser originária do ectoderma embrionário, como proposto por Balinsky e Fabian (4).

A epiteliogênese imperfeita pode ser considerada uma doença congênita recessiva ligada ao sexo e tem maior expressão em machos do que em fêmeas. A baixa incidência de epiteliogênese imperfeita observada dentro de leitegadas afetadas conduziria a uma herança autossômica recessiva compatível com a doença (2). No entanto, com este tipo de informação hereditária, uma proporção aproximadamente igual de machos e fêmeas afetados seria

esperada. Porém, a alta proporção de fêmeas infectadas sugere, ao defeito relacionado ao sexo, a herança recessiva ligada ao cromossomo X. As manifestações vão estar presentes nos machos porque eles têm apenas um cromossomo X, sendo assim, não têm nenhum gene normal para aquela característica e, nas fêmeas quando existe alguma manifestação clínica, em geral é mais leve (5).

Em um estudo com potros, a doença foi associada a um defeito da lâmina 5 na lâmina lúcida da membrana basal que permite a separação da epiderme da derme (6). Trabalhos que reportam este caso em matrizes suínas de diferentes partos descartam que esteja associado à idade da fêmea (7). Já outros estudos demonstram ser um defeito congênito presente ao nascimento, mas não necessariamente de origem hereditária e compatível com baixa incidência dentro de uma leitegada ou rebanho (2). A frequência de alguns defeitos presentes ao nascimento, mas não necessariamente de origem hereditária, pode ser maior para machos ou fêmeas quando o risco é modificado por sexo, como se vê, por exemplo, com defeitos de fechamento dos tubos neurais de seres humanos, em que as fêmeas parecem ser mais predispostas (8).

Em alguns relatos de médicos veterinários, casos de Epidermólise Bolhosa foram descritos como aplasia cutânea devido às semelhanças nas lesões. Mas, de acordo com o estudo do mesmo autor, ao nível de microscopia óptica, lesões da *E. bullosa* não são compatíveis, já que apresentam lesões que atingem a derme, enquanto na aplasia cutânea somente ocorrem danos em níveis de epitélio. No nível microscópico, muitas vezes podem ser observadas fissuras dermo epidérmicas nas margens das lesões e os apêndices estão normalmente presentes no interior das lesões (9). Neste estudo, as lesões microscópicas não eram compatíveis com epidermólise bolhosa. Na verdade, fendas dermo-epidérmicas não foram observadas e os defeitos cutâneos eram estendidos a superfície da derme e restritos à metade caudal do corpo.

Por não haver muitos relatos, o tratamento torna-se controverso, podendo ser viável em alguns casos. Nas lesões, devem ser administrados antibióticos ou desinfetantes não irritantes para prevenir indesejáveis situações secundárias, como a septicemia. O efeito curativo pode ser alcançado com pomadas/cremes cicatrizantes para estimular a cicatrização das feridas (2). Assim, para estimular a epitelização do animal apresentado neste caso, foi utilizada uma solução com sulfonamida, cera de abelha, ureia e óleo mineral.

As sulfonamidas são análogos estruturais do PABA (ácido paraminobenzóico). Para o micro-organismo formar o ácido diidropteróico ele precisa utilizar o PABA, então as sulfonamidas, por meio de inibição competitiva, impedem a incorporação do PABA agindo assim como antimetabólito. As sulfonamidas impedem o crescimento pela inibição da síntese do ácido fólico, exercendo ação bacteriostática (10). A ureia, altamente solúvel em água, atua solubilizando ou desnaturando as proteínas, proporcionando ação hidratante, queratolítica, antibacteriana e estimulante da regeneração celular - cicatrizante - (11). A cera de abelha possui propriedades emolientes, amaciantes, moldantes, impermeabilizantes, cicatrizantes, anti-inflamatória e antibacteriana (12).

O óleo mineral também tem potencial cicatrizante e favorece a formação do tecido de granulação. Aumenta a resposta imune, acelerando o processo inflamatório, e conseqüentemente estimulando o processo de cicatrização por meio da angiogênese e da epitelização, facilitando a entrada de fatores de crescimento na célula (13).

Portanto, a prole com este tipo de alteração cutânea, e que sobrevivem, não devem ser mantidas como futuros reprodutores (2). E ainda, como esta condição é esporádica e afeta alguns animais dentro de uma ninhada, e por causa do uso generalizado de doses inseminantes heterospermicas, seria de difícil rastreamento e, provavelmente, economicamente inviável tentativas de prevenção da doença pela eliminação de animais do plantel. Assim, como demonstrado nesse estudo, a epitelização pode ocorrer quando as lesões não são muito extensas e disponibilizados tempo e cuidados com o animal.

REFERÊNCIAS

1. Zachary JF, Mcgavin MD. Bases da patologia em veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
2. Benoit-Biancamano MO, Drolet R, D'Allaire S. Aplasia cutis congenita (epitheliogenesis imperfecta) in swine: observations from a large breeding herd. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:573-8.
3. Drolet B, Prendiville J, Golden J, Enjolras O, Esterly NB. Membranous aplasia cutis with hair collars. Congenital absence of skin or neuroectodermal defect? *Arch Dermatol.* 1995;131(12):1427-31.
4. Balinsky BI, Fabian BC. An introduction to embryology. Philadelphia: Brooks Cole; 2012.
5. Rothschild MF, Ruvinsky A. The genetics of the pig. 2nd ed. Cambridge: CABI; 2011.
6. Lieto LD, Cothran EG. The epitheliogenesis imperfecta locus maps to equine chromosome 8 in American Saddlebred horses. *Cytogenet Genome Res.* 2003;102(1-4):207-10.
7. Montese VJ, Cardona AJ. Aplasia cútis em suínos. *Rev Colomb Cienc Anim.* 2014;6(1):243-7.
8. Tortora JG, Derrickson B. Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. 8a ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 606 p.
9. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet.* 2000;9(6):993-1000.
10. Deck HD, Pharm D, Winston GL. Antibióticos beta-lactâmicos & outros inibidores da síntese da parede celular. In: Katzung BG, Masters BS, Trevor JA. Farmacologia básica e clínica. Porto Alegre: Amgh; 2014. p.790-808.
11. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An Bras Dermatol.* 2003;78(5):525-42.
12. Malavazzi GR, Lake JC, Dantas PEC. Efeito do mel e do soro autólogo na cicatrização do epitélio corneano em coelhos. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68(3):347-51.
13. Ferreira AM, Souza BMV, Rigotti MA, Loureiro MRD. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. *Rev Esc Enferm USP.* 2012;46:752-60.

Recebido em: 08/04/2015**Aceito em: 11/05/2016**

ENTENDENDO AS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM UM QUADRO DE PIOMETRA: ESTUDO DE UM RELATO DE CASO

Pâmela Ayres Martinuzzi¹
Helen Cabaldi Franz¹
Thaiane Albuquerque²
Letícia Reginato Martins³
Carmen Lucia Garcez Ribeiro⁴
Ana Raquel Mano Meinerz⁴

RESUMO

A presença de alterações tóxicas em neutrófilos indica aceleração da neutropoiese e está associada a intensos processos inflamatórios e bacterianos. O leucograma raramente fornecerá informações de caráter patognomônico de uma enfermidade, no entanto, sabe-se que as informações contidas nessa análise fornecem subsídios ao clínico que auxiliam na elaboração de diagnóstico. Nesse sentido, o objetivo do presente relato foi descrever e discutir as alterações hematológicas em um dos quadros de maiores índices de morbidade e mortalidade na rotina da clínica veterinária, o quadro de piometra, destacando as alterações morfológicas leucocitárias que podem conduzir a terapêutica e o prognóstico do paciente.

Palavras-chave: anemia, leucograma, enfermidade, infecções bacterianas.

UNDERSTANDING HEMATOLOGIC CHANGES IN A PYOMETRA FRAME: STUDY OF A CASE REPORT

ABSTRACT

The presence of toxic changes in neutrophils indicates acceleration neutropoiese and is associated with severe inflammation and bacterial. The WBC rarely pathognomonic provide background information of an illness, however, it is known that the information in this analysis provide subsidies that help the clinician in making a diagnosis. In this sense, the objective of this report was to describe and discuss the hematological changes in one of the frames of the highest rates of morbidity and mortality in routine veterinary clinic, pyometra framework, highlighting the WBC morphological changes that can lead to therapy and prognosis patient.

Keywords: anemia, white blood cell count, disease, bacterial infections.

¹ Residente em Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. pamela.martinuzzi@hotmail.com.

² Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Residente em Clínica Médica de Animais de Companhia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

LA COMPRESIÓN DE LOS CAMBIOS HEMATOLÓGICOS A UN SIGNO CLÍNICO DE PIOMETRA: ESTUDIO DE UN CASO

RESUMEN

La presencia de cambios tóxicos en los neutrófilos indica neutropoiesis aceleración y se asocia con inflamación severa y bacteriana. El leucograma raramente proporciona informaciones de carácter patognomónico antecedentes de una enfermedad, sin embargo, se sabe que la información en este análisis proporciona subvenciones que ayudan al médico a hacer un diagnóstico. En este sentido, el objetivo de este informe es describir y analizar los cambios hematológicos en uno de los marcos de las más altas tasas de morbilidad y mortalidad en la clínica veterinaria de rutina, caso de piometra, destacando los cambios morfológicos que pueden conducir a la terapia y el pronóstico paciente.

Palabras clave: anemia, recuento de glóbulos blancos, enfermedades, infecciones bacterianas.

INTRODUÇÃO

A literatura esclarece que o leucograma raramente fornecerá informações de caráter patognomônico de uma enfermidade, no entanto, sabe-se que as informações contidas nessa análise fornecem subsídios ao clínico que auxiliam na elaboração do diagnóstico diferencial, na avaliação da gravidade de determinada doença e ainda poderá ser útil no fornecimento do prognóstico da mesma. Assim fica estabelecido que o conhecimento da produção, distribuição e fisiopatologia dos leucócitos são essenciais para a interpretação do significado do leucograma (1).

Nesse sentido o presente relato objetiva descrever e discutir as alterações hematológicas em um dos quadros de maiores índices de morbidade e mortalidade na clínica veterinária, o quadro de piometra, discutindo as alterações quantitativas e qualitativas, incluindo as alterações morfológicas presentes nas células sanguíneas.

RELATO DE CASO

O caso descrito refere-se a uma fêmea canina, SRD, 10 anos, atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (HCV-UFPel). O animal apresentava aumento de volume abdominal, desconforto na palpação abdominal, apatia, mucosas pálidas e hipertermia. Na anamnese, o proprietário relatou que não houve nenhuma alteração quanto à alimentação e ingestão de líquidos, no entanto, segundo informações do proprietário, o animal apresentava-se mais apático do que o habitual, relatando que o mesmo entrou em cio poucas semanas antes ao desenvolvimento do quadro.

Foi solicitado como exame complementar a ultrassonografia abdominal, além de hemograma, proteína plasmática total (PPT) e a dosagem de fibrinogênio plasmático. Os achados obtidos a partir das imagens ultrassonográficas confirmou a suspeita de piometra. Com relação aos achados hematológicos observados, detectou-se: redução da massa eritrocitária (Hemácias $4,2 \times 10^6$, Hemoglobina 9,7 g/dl e Hematócrito 30%) caracterizando

um quadro anêmico; leucocitose (28.000 μ l) com aumento quantitativo paralelo de bastonetes (Figura 1-A) determinando um desvio à esquerda além da presença de corpúsculo de Dohle (Figura 1-B). A PPT apresentou-se elevada (8,8g/dl) confirmando a desidratação da paciente, assim como os índices de fibrinogênio que se mostraram superiores ao esperado para a espécie estudada (600 mg/dl).

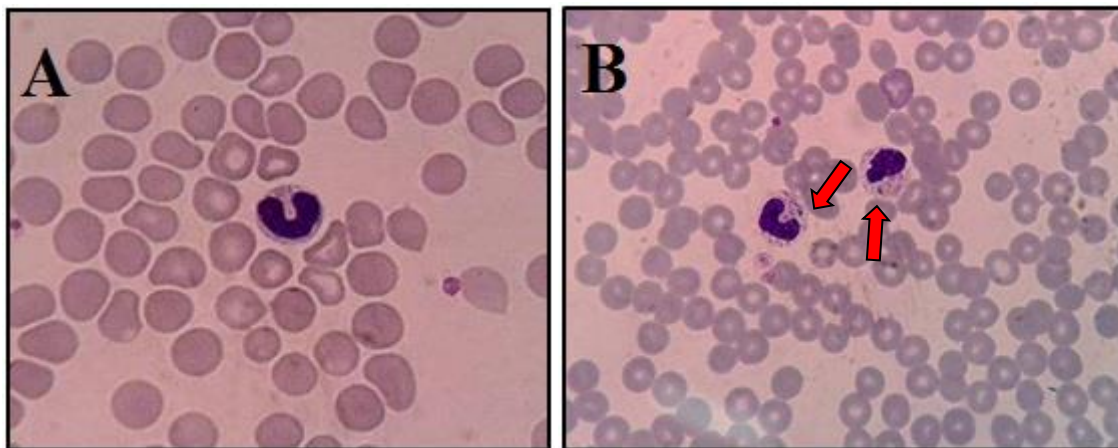


Figura 1. A- Neutrófilo bastonete indicando desvio (Coloração panótico rápido 1000x). B- Corpúsculo de Dohle (setas) (Coloração panótico rápido, 400x). Laboratório de Patologia Clínica HCV-FPEL.

DISCUSSÃO

Com relação à anemia detectada, essa alteração era esperada no quadro, pois segundo a literatura a piometra é uma doença inflamatória crônica, sendo que frequentemente observa-se como alteração no eritrograma uma discreta anemia normocítica normocrômica não regenerativa. Essa anemia se dá pela perda de eritrócitos por diapedese para o lúmen uterino ou à depressão tóxica da eritropoiese (2). Não foi detectada elevação numérica do VCM (Volume Corpuscular Médio) ou observadas alterações morfológicas na análise microscópica do esfregaço sanguíneo que pudesse indicar regeneração medular como: anisocitose e policromasia. No entanto, o quadro anêmico normalmente deve ser restabelecido uma vez que a piometra for devidamente tratada (3,4,5).

Com relação aos achados leucocitários, a literatura informa que em pacientes que não se encontram em um quadro de septicemia, o leucograma pode estar sem alterações significativas. No entanto, a leucometria em cadelas com piometra é quase sempre característica de inflamação supurativa ou purulenta, acarretando em leucocitose, neutrofilia com desvio à esquerda, presença de formas imaturas e monocitose substancial (2,5). A leucocitose acompanhada de linfocitopenia é diretamente proporcional à gravidade da doença (5). É importante salientar que esse processo inflamatório de origem endócrino-hormonal está associado em sua evolução às infecções bacterianas, constituindo um intenso complexo patológico (6). No entanto, poderá ocorrer com uma clínica não característica, onde a única observação é a presença de secreção vulvar e, no hemograma pode-se observar uma contagem normal de leucócitos com uma leve neutrofilia (7).

Outro achado detectado na análise qualitativa do leucograma foi a presença de neutrófilos tóxicos, como o corpúsculos de Döhle. Esses são neutrófilos liberados da medula óssea antes de completarem sua maturação. Normalmente, eles migram aos vasos sanguíneos

quando a demanda tecidual de neutrófilos é alta, como é esperado no caso descrito. Pelo fato de ainda não estarem completamente bem formados, são liberados com quantidades anormais de organelas citoplasmáticas (8). Apesar de a literatura citar que os corpúsculos de Döhle são infrequentes em cães (9) e apresentando-se em maior frequência em gatos, no presente relato o animal apresentou essa alteração. Estudos informam que essa alteração leucocitária também pode ser detectada em outras espécies além dos cães e gatos, como no cavalo e em humanos (10,11). Em seres humanos, o aparecimento destes corpúsculos é um achado sensível para infecções bacterianas (11).

A quantidade e o tipo de toxicidade neutrofílica parecem ter relação com a gravidade da doença e dos sinais clínicos em cães e gatos, sendo que o número de células alteradas está associado ao prognóstico da enfermidade. No caso descrito, foi observado um alto número de células apresentando a alteração, salientando que o paciente se mostrava intensamente apático, hipertérmico e com provável quadro de choque endotóxico. A presença destas alterações tóxicas nos neutrófilos de cães está mais associada com inflamações de caráter sistêmico do que localizado e na maioria dos casos devido às infecções bacterianas, bacteremia, abscessos e septicemia (12,13); intensos processos inflamatórios (14) e toxicidade a determinados fármacos (13,15,16).

Com relação às alterações detectadas no fibrinogênio plasmático, está estabelecido que esse parâmetro tende a se elevar frente a um aumento quantitativo de mediadores envolvidos na resposta inflamatória. Assim, a hiperfibrinogenia detectada indica que a enfermidade instalada se encontra no curso agudo, o que é esperado para a piometra, em que o quadro mobiliza intensamente a resposta celular e mediadores envolvidos ao processo inflamatório na tentativa de debelar o agente ou as toxinas envolvidas com o quadro (17).

CONCLUSÃO

Considerando o caso descrito, o trabalho chama atenção do clínico veterinário à urgência de todas as manobras clínicas, diagnósticas, cirúrgicas e terapêuticas relacionadas à piometra, devido à gravidade do quadro. Assim, o reconhecimento dos achados hematológicos, especialmente os contidos no leucograma, é fundamental para o direcionamento do diagnóstico, principalmente nos casos em que os sinais clínicos ainda não são típicos da enfermidade. Salienta-se ainda que a interpretação de informações adicionais contidas no hemograma, como a presença do corpúsculo de Dohle, é de auxílio ao prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

1. Pande N, Prabhakar S, Gandotra VK, Honparkhe M, Nanda AS. Efficacy of different techniques for diagnosis of pyometra in female dogs. *Indian J Anim Reprod.* 2006;27:31-3.
2. Rabelo RC. Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais: conduta no paciente crítico. 1a ed. Rio de Janeiro: LF livros; 2005.
3. Feldman EC, Nelson RW. Canine e feline endonology and reproduction. 2nd ed. Phyladelphia: WB Saunders Company; 1996.

4. Ferreira CR, Lopes MD. Complexo hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas-revisão. *Rev Clin Vet.* 2000;25:36-44.
5. Fossum TW. *Cirurgia de pequenos animais.* 3a ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2008.
6. Grunert E, Birgel EH, Val WG. *Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos- ginecologia.* São Paulo: Varela; 2005.
7. Dow C. The cystic hiperplasia- pyometra complex in the bitch. *Vet Rec.* 1957;69:1409-15.
8. Weiser G. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: Thrall MA. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária.* 1a ed. São Paulo: Roca; 2007. p.127-40.
9. Gossett KA, Carakostas MC. Effect of EDTA on morphology of neutrophils of healthy dogs and dogs with inflammation. *Vet Clin Pathol.* 1985;13:22-5.
10. Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Duncan e Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology.* 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2003.
11. Al-Gwaiz LA, Babay HH. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphological changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract.* 2007;16:344-7.
12. Macheversky AM, Read RA. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. *Aust Vet J.* 1999;77:232-7.
13. Schultze AE. Interpretation of canine leukocyte responses. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's veterinary hematology.* Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. p.321-34.
14. Latimer KS, Rakich PM. Clinical interpretation of leukocytes responses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1989;19:639-68.
15. Gosset KA, MacWilliams PS. Ultrastructure of canine toxic neutrophils. *Am J Vet Res.* 1982;43:1634-7.
16. Gieger TI, Correa SS, Taboada J, Grooters AM, Johnson AJ. Phenol poisoning in three dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;4:317-21.
17. Andrews DA, Reagan WJ, Denicola DB. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. *Compend Cont Educ Pract Vet.* 1994;10:1349-57.

Recebido em: 22/05/2015

Aceito em: 11/06/2016

O SUCESSO DA *NUX VOMICA* EM TRÊS CASOS DE CÃES COM INJÚRIA GÁSTRICA POR ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL

Maria Eugenia Carretero¹
Nilson Roberti Benites²

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são comumente prescritos aos cães com dor e inflamação em geral. No entanto, existem reações adversas que culminam em lesões na mucosa gastrointestinal (GI) que podem causar hemorragias e até perfurações. Nesses casos, é preciso um tratamento rápido, eficaz e que não prejudique a integridade da mucosa GI. Assim, o objetivo desse artigo é relatar a eficiência do uso da *Nux vomica* em três casos caninos com lesão na mucosa GI causada por AINEs. Concluiu-se que o uso da *Nux vomica* em casos de severa lesão no GI foi suficiente para o cancelamento da transfusão sanguínea e melhora permanente e rápida em dois dos três casos relatados.

Palavras-chave: anti-inflamatório não esteroidal, anemia, lesão gástrica, *Nux vomica*, cão.

THE SUCCESS OF *NUX VOMICA* IN THREE CASES OF DOGS WITH GASTRIC INJURY BY NON-STEROIDAL ANTIINFLAMMATORIES

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) are usually prescribed to dogs with pain and general inflammation. However, there are side effects culminating on gastrointestinal (GI) epithelium lesions, that can cause bleeding and perforations. In these cases, it is necessary an effective and fast treatment that does not injure the GI epithelium. The purpose of this paper is to relate *Nux vomica*'s efficiency on three cases of dogs with GI lesions caused by NSAIDs. It was concluded that the use of *Nux vomica* on severe GI lesion cases was enough to avoid blood transfusion as well as fast and permanent recovery on two of the three cases.

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatories, anemia, gastric lesion, *nux vomica*, dog.

EL EXITO DE *NUX VOMICA* EN TRES PERROS CON LESIONES GÁSTRICAS POR ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

RESUMEN

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) son prescritos como rutina para perros con dolor y inflamación en general. Sin embargo, hay reacciones adversas que culminan en lesiones de mucosas gastrointestinales (GI) que pueden causar hemorragias y incluso perforación. En estos casos, es necesario un tratamiento rápido, eficaz y que no cause daños a la integridad de la mucosa gastrointestinal. Así, el objetivo de este informe es presentar la eficiencia del uso de *Nux vomica* en tres casos caninos con lesión gastrointestinal provocado por AINEs. Se concluyó que el uso de la *Nux vomica* en los casos de lesiones grave GI fue suficiente para

¹ Mestre em patologia animal pelo Departamento de Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Correspondência. www.veterinariahomeopatia.com.br

² Professor associado do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

cancelar la transfusión de sangre associada a rápida y permanente mejora dos de los tres casos examinados.

Palabras clave: anti-inflamatorios no esteroideos, anemia, lesión gástrica, *Nux vômica*, perro.

INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são prescritos aos cães devido a sua ação anti-inflamatória e analgésica. A ação dos AINEs se dá pela inibição das prostaglandinas e cicloxigenase 1 e 2 que apresentam, entre suas funções, manter a integridade da mucosa gastrointestinal (GI). Nesse contexto, o uso dos AINEs em cães pode gerar uma série de injúrias na mucosa GI resultando em inapetência, náusea, vômito, diarreia, hemorragia e perfuração. Assim, a medicina alopática comumente associa aos AINEs, os protetores de mucosa que por vezes mostram-se ineficazes. Tendo em vista o risco de efeitos adversos, é de importância na rotina clínica veterinária o conhecimento de técnicas alternativas que permitam a cura rápida e eficaz.

Especialmente os cães são mais suscetíveis às injúrias na mucosa GI causadas pelos AINEs, quando comparado aos humanos (1). Em cães é frequente a lesão na mucosa GI após a administração dos AINEs (2-5). No entanto, valores da incidência e sua frequência ainda não foram relatados (6). Em seres humanos, 25% dos pacientes que ingerem cronicamente os AINEs desenvolvem úlceras, enquanto que 2-4% sofrem hemorragia ou perfuração na mucosa GI (7).

Assim, o objetivo deste trabalho é relatar três casos distintos de ingestão de AINEs associados à hemorragia da mucosa GI e a eficiência do tratamento realizado com o medicamento homeopático *Nux vomica*.

RELATO DE CASO

Três cães de raça, sexo e idades diferentes foram internados em Hospital Veterinário particular com queixa principal de dor abdominal epigástrica intensa, vômito com sangue não digerido, mucosas oral e ocular brancas, apatia severa e anorexia. Na história clínica, revelou-se que os três animais ingeriram AINEs (dipirona sódica) concomitante ao protetor de mucosa cimetidina.

Segundo as informações obtidas com os proprietários, apresentadas na Tabela 1, confirmou-se que o caso 1 uma fêmea adulta, quatro anos de idade, castrada, da raça Mastiff inglês recebeu a dose de 25mg/kg. O caso 2 um macho adulto, dois anos de idade, castrado, sem raça definida recebeu a dose de 30mg/kg e o caso 3 uma fêmea adulta, seis anos de idade, castrada, da raça Pincher recebeu a dose de 250mg/kg, único caso que recebeu a dose acima do recomendado por bulários veterinários: 25-30mg/kg (8).

No momento da entrada desses animais na internação, foi realizado hemograma simples (Tabela 2), seguido de tratamento com fluidoterapia com 250 ml de soro fisiológico 0,9% e 1 mL de glicose 50% endovenosa, que foi mantida até 48 horas de evolução, sem associação de medicamentos alopáticos.

Tabela 1. Distribuição dos casos conforme gênero, idade (anos), raça e dose administrada de anti-inflamatório não esteroidal (AINE).

| Caso | Gênero | Idade (anos) | Raça | Dose administrada |
|------|--------|--------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Fêmea | 4 | Mastiff inglês | 25mg/kg |
| 2 | Macho | 2 | Sem raça definida | 30mg/kg |
| 3 | Fêmea | 6 | Pincher | 250mg/kg |

Tabela 2. Distribuição dos resultados obtidos por hemograma e leucograma no momento da entrada dos animais (0 horas) e após 24 horas de permanência no Hospital Veterinário conforme os casos estudados e os valores de referência.

| Variável | Identificação | 0 horas | 24 horas | Valor de referência |
|---|---------------|---------|----------|--------------------------|
| Hemácias (10⁶/mm³) | Caso 1 | 3.0 | 6.0 | 6 a 8 |
| | Caso 2 | 3.2 | 6.7 | |
| | Caso 3 | 1.2 | 5.3 | |
| Hematócrito (%) | Caso 1 | 15 | 35 | 37 a 54 |
| | Caso 2 | 28 | 38 | |
| | Caso 3 | 8 | 32 | |
| Hemoglobina (g/dl) | Caso 1 | 5.6 | 12.2 | 12 a 18 |
| | Caso 2 | 6.7 | 15.1 | |
| | Caso 3 | 2.5 | 11.8 | |
| Leucócitos por µL | Caso 1 | 8.000 | 8.000 | 6.000 a 15.000 |
| | Caso 2 | 7.000 | 8.000 | |
| | Caso 3 | 6.000 | 6.000 | |
| Linfócitos por µL | Caso 1 | 2.000 | 2.000 | 1.500 a 5.000 |
| | Caso 2 | 1.500 | 3.000 | |
| | Caso 3 | 0.200 | 0.200 | |
| Segmentados por µL | Caso 1 | 4.000 | 4.500 | 3.000 a 11.000 |
| | Caso 2 | 3.600 | 4.500 | |
| | Caso 3 | 4.800 | 4.300 | |
| Plaquetas | Caso 1 | 200.000 | 250.000 | 150.000 a 500.000 |
| | Caso 2 | 250.000 | 251.000 | |
| | Caso 3 | 100.000 | 326.000 | |

Em seguida, realizou-se uma repertorização manual e artística utilizando o repertório de Kent (9), no qual os sintomas comuns aos três casos foram convertidos em rubricas repertoriais:

Sintomas gerais

Anemia: *Generalities, anemia after hemorrhage*

Mucosas oral: *Mouth, discoloration, gums, white*

Dor abdominal intensa: *Abdomen, pain, hypochondria*

Emese com sangue não digerido: *Stomach, vomiting, blood*

Sintomas mentais

Agressividade, violência e ataca até o dono: *Mind, anger, violent*

Utilizando-se matérias médicas, sabe-se que, particularmente, a *Nux vomica* está associada e, portanto, trata quadros clínicos em que ocorrem processos estomacais logo após se alimentar, vômitos de alimentos no período da manhã, dispepsias crônicas e processos espasmódicos no sistema digestório (10). Segundo a matéria médica de Allen (10), o estômago parece muito irritado, há cólica por indigestão que causa respiração curta, constipação com cólica e desejo frequente de defecar, disenteria com tenesmo violento, presença de náusea, vômito e disenteria principalmente depois de administração de medicamentos alopáticos com secreção de muco e sangue (10).

Os animais foram levados ao Hospital Veterinário devido à dor abdominal intensa e emese com sangue que são sinais clínicos característicos de uma doença aguda. Dessa maneira, utilizam-se potências baixas, como CH6, do medicamento homeopático selecionado ao invés de se administrar medicamento com potência muito elevada, como o CH30, capaz de agravar o caso.

Nas doenças agudas utilizam-se potências baixas associadas à frequências elevadas de administração do medicamento homeopático para, desta forma, produzir uma ação estímulo medicamentoso por tempo prolongado (11).

Dessa forma, iniciou-se imediatamente a administração de 1mL de *Nux vomica* 6CH via oral, quatro vezes seguidas a cada dez minutos. A melhora foi observada na segunda administração caracterizada pela coloração rósea das mucosas oral e oculares. Na hora seguinte do início do tratamento os animais não apresentaram êmese, levantaram-se do leito, urinaram e, apenas o Caso 3 ingeriu voluntariamente água.

Após 24 horas, devido ao hemograma prévio (Tabela 2), optou-se por cancelar o procedimento de transfusão sanguínea nos três casos. Em 48 horas retirou-se a fluidoterapia devido à ingestão normal e voluntária de água. Em 72 horas de evolução os animais aceitaram a ingestão de alimento pastoso, sendo que o Caso 3 foi o único a aceitar ração seca.

Com 96 horas de evolução da injúria na mucosa GI por AINEs, os animais foram liberados da internação no Hospital Veterinário e os proprietários foram informados sobre o retorno imediato se houvesse manifestação de qualquer sintoma.

O Caso 3, após uma semana de evolução, veio a óbito subitamente, sem sintomas, à noite enquanto dormia, segundo relato do proprietário. A necropsia, realizada por um veterinário patologista terceirizado, não evidenciou a causa da morte. Particularmente, na mucosa gástrica, observou-se único foco com depressão da mucosa sem hemorragia, possivelmente um local de cicatrização. A serosa gástrica não apresentou alterações macroscópicas evidentes, sugerindo que não houve perfuração.

Os casos 1 e 2, conforme os proprietários, não apresentaram outros sintomas GI. E, somente o caso 1 após três meses de tratamento com *Nux vomica* 6CH apresentou sintomas na pele. Dessa maneira, realizou-se uma repertorização manual e artística utilizando o repertório de James Tyler Kent (9). Os sintomas foram convertidos nas seguintes rubricas repertoriais:

Sintomas gerais

Erupções que coçam: *Skin, eruptions, herpetic, itching.*

Sintomas mentais

Pede colo constantemente: *Mind, carried, desires to be.*

Segundo a matéria médica de Allen (10) o medicamento *Arsenicum album* apresenta semelhanças ao paciente do caso 1 e, portanto utilizou-se a dinamização de CH18, devido à sua cronicidade, com dosagem de 1 ml à noite apenas, conforme método de dose única instituído por Hahnemann (11).

Quando se compreende o processo de sensibilização das terminações nervosas e o processo dinâmico da força vital, descritos respectivamente nos parágrafos 72 e 272 do Organon da Arte de Curar (11) nota-se que é perfeitamente compatível a cura de doenças agudas através da homeopatia. Os três relatos analisados evidenciam a melhora do quadro de reação adversa ao AINE, quando os momentos 0 e 24 horas são comparados quanto aos resultados das hemácias, hematócrito, hemoglobina (Tabela 2) e evolução clínica dos três casos estudados.

CONCLUSÃO

O uso do medicamento homeopático *Nux vomica* CH6, com doses repetidas, apresentou efeitos positivos nos sintomas clínicos e no hemograma de três cães com severa lesão na mucosa GI causada por AINEs. Os resultados apresentados evitaram a transfusão sanguínea e melhora permanente em dois dos três casos relatados.

REFERÊNCIAS

1. Lin LS, Kayasuga Y, Shimohata N, Kamata H, Echigo R, Mochizuki M, et al. Lyophilized aspirin with trehalose may decrease the incidence of gastric injuries in healthy dogs. *J Vet Med Sci.* 2012;74:1511-6.
2. Daehler MH. Transmural pyloric perforation associated with naproxen administration in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:694-5.
3. Godshalk CP, Roush JK, Finland RB, Sikkema D, Vorhies MW. Gastric perforation associated with administration of ibuprofen in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:1734-6.
4. Shaw N, Burrows CF, King RR. Massive gastric hemorrhage induced by buffered aspirin in a greyhound. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1997;33:215-9.
5. Curry SL, Cogar SM, Cook JL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: a review. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2005;41:298-309.
6. Baan M, Sherding RG, Johnson SE. Effects of zinc-L-carnosine and vitamin E on aspirin-induced gastroduodenal injury in dogs. *J Vet Intern Med.* 2011;25:39-46.
7. Lanza FL, Chan FK, Quigley EM, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Guidelines for prevention of NSAID-related ulcer complications. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:728-38.
8. Crivellenti LZ, Borin-Crivellenti S. *Bulário médico veterinário cães e gatos.* São Paulo: MedVet; 2013.
9. Kent JT. *Repertory of the homeopathic materia medica.* New Dehli: B Jain Publishers; 2009.
10. Allen TF. *Hand book of materia medica and homeopathic therapeutics* [Internet]. Philadelphia: Hahnemann Publishing House; 2013 [cited 2013 Apr 13]. Available from: <http://www.homeoint.org/books1/allenhandbook/index.htm>.
11. Hahnemann S. *Exposição da doutrina homeopática, ou, organon da arte de curar.* Castro D, Rezende Filho KC, tradutores. 5a ed. São Paulo: GEH Benoit Müre; 1986.

Recebido em: 22/04/2015**Aceito em: 03/08/2016**

LEIOMIOSSARCOMA VESICAL EM CADELA - RELATO DE CASO

Vivian Lima de Souza¹
Cristiane de Abreu Estanislau¹
José Joaquim Tilton Ranzani²
Bruno Watanabe Minto³
Leonardo Delatorre Kairalla¹
Carina Marchiori Carvalho¹
Luciana Moura Campos Pardini¹
Débora Rodrigues dos Santos Barone¹
Maria Jaqueline Mamprim⁴
Cláudia Valéria Seullner Brandão¹

RESUMO

As neoplasias de vesícula urinária são incomuns nos cães, no entanto, representam as de maior ocorrência no trato urinário. O objetivo deste trabalho é descrever uma neoplasia mesenquimal maligna na bexiga de um cão fêmea, de 2 anos e 7 meses de idade, que apresentava hematuria e disúria. O paciente foi submetido a exérese da massa neoplásica e, apresentou remissão completa dos sinais clínicos apresentados.

Palavras-chave: cães, neoplasia, bexiga, cirurgia, oncologia.

BLADDER LEIOMYOSARCOMA IN DOG - CASE REPORT**ABSTRACT**

Bladder tumors is uncommon in dogs, however, it is the most diagnosed in the urinary tract. A 31-month-old female mongrel dog was presented with signs of hematuria and dysuria. A bladder neoplasm malignant mesenchymal tumor was diagnosed. The dog was undergone to surgical excision and showed complete remission of signals.

Keywords: dogs, neoplasia, bladder, surgery, oncology.

LEIOMIOSARCOMA DE VEJIGA EN PERRA - REPORTE DE UN CASO**RESUMEN**

Neoplasias de la vejiga urinaria son poco comunes en los perros, pero son las más frecuentes en el tracto urinario. El objetivo de este trabajo es describir una neoplasia mesenquimal maligna en la vejiga urinaria de un perro, hembra, 2 años y 7 meses de edad, que presentaba hematuria y disuria. El paciente fue tratado por cirugía mediante exéresis de la masa neoplásica y presentó una remisión completa de los síntomas clínicos.

Palabras clave: perros, neoplasia, vejiga, cirugía, oncología.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Botucatu.

³ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Jaboticabal.

⁴ Professora do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Botucatu.

INTRODUÇÃO

As neoplasias vesicais em cães ocorrem mais frequentemente do que as demais envolvendo o sistema urinário (1). As neoplasias mesenquimais malignas de vesícula urinária são incomuns em cães (2) e correspondem a cerca de 2% do total de neoplasias na espécie canina, sendo raras em gatos (3). As fêmeas são diagnosticadas com maior frequência (3), diferente do observado na medicina humana, em que o câncer de bexiga ocorre mais frequentemente em homens (75%) (4).

Fatores de risco para neoplasias vesicais incluem exposição a inseticidas e herbicidas, obesidade, possível administração de ciclofosfamida, ser do sexo feminino e a raça (5), das quais se destacam Scottish Terrier, Shetland, Sheedog, Beagle, Collie e São Bernardo (3).

Os tumores vesicais normalmente apresentam sinais similares aos da cistite crônica, incluindo hematúria, disúria e polaquiúria. A urinálise completa e o exame citológico por lavagem vesical são necessários para diferenciação entre cistite e neoplasia, embora a hematúria e proteinúria sejam achados de ambas as afecções. Entretanto, alguns tumores, particularmente sarcomas, não são facilmente diagnosticados pelo exame citológico (6).

A cistectomia parcial é indicada em casos de neoplasias benignas, podendo ser removidos até dois terços do corpo vesical, sem que altere a sua funcionalidade (1,6). O tratamento quimioterápico pode ser realizado com alguns benefícios (3), sendo que a utilização de agentes anti-inflamatórios pode beneficiar até 50% dos pacientes e ainda apresentar a remissão completa (7).

O prognóstico, na maioria dos casos, é de reservado a ruim, devido à natureza agressiva dos tumores e da pouca resposta às terapias possíveis (3).

RELATO DO CASO

Foi atendido um animal da espécie canina, da raça Rottweiler, fêmea, pesando 32 Kg, com dois anos e sete meses de idade. No histórico foram relatados disúria e hematúria há uma semana. Foi realizada sondagem vesical (sonda nº08) sem dificuldade, não sendo observada alteração na coloração da urina. As amostras coletadas (20 mL) foram encaminhadas para urinálise tipo I e exame microbiológico. Na urinálise foram verificadas duas cruzes de sangue oculto e 5 a 10 hemácias por campo, sem demais alterações. O laudo microbiológico revelou cultivo aeróbico negativo. Adicionalmente foi realizado um lavado vesical, a fim de promover esfoliação da massa luminal para a realização do exame citológico.

A análise citológica revelou celularidade moderada composta de quantidade acentuada de eritrócitos, macrófagos e raros neutrófilos; bem como de células epiteliais individualizadas e por vezes em grupos, de citoplasma basofílico amplo vacuolizado, núcleo arredondado com cromatina granular, nucléolo distinto, presença de anisocariose e anisocitose acentuadas. Tal exame foi sugestivo de neoplasia epitelial maligna, com indicação para confirmação por meio do exame histopatológico.

Um novo exame ultrassonográfico foi realizado, sendo visibilizada estrutura nodular na porção caudal da bexiga (região do trígono), de aspecto heterogêneo, hiperecogênica, medindo 2,23 x 1,88 cm e com áreas hipocogênicas entremeadas, medindo aproximadamente 1,41 x 0,91 cm, sendo sugestiva de neoformação na vesícula urinária.

Inicialmente, foi prescrito firocoxibe (Previcox[®], 5mg/kg/SID/continuadamente), bem como a manutenção da Oxitetraciclina conforme prescrito anteriormente, até completar 21 dias. Baseando-se no resultado citológico de neoplasia epitelial foi proposto um protocolo quimioterápico com firocoxibe (5mg/kg/SID/continuadamente) e carboplatina (300mg/m²/IV a cada 21 dias). A primeira aplicação foi realizada no sexto dia após o atendimento inicial e correspondeu a um volume total 31,5 mL de carboplatina por via intravenosa durante 30

minutos, acrescidos de 30 minutos de solução fisiológica. A segunda aplicação da carboplatina foi feita, bem como a manutenção da administração oral do firocoxibe.

No quadragésimo primeiro dia foi realizado exame ultrassonográfico que revelou a vesícula urinária repleta com conteúdo anecóico e sedimentos em suspensão ao movimento de balotamento, paredes espessadas (0,8-1,7cm) e irregulares em região próxima de trígono, onde há estrutura de ecogenicidade heterogênea de limites definidos e irregulares, medindo aproximadamente 2,02 x 2,38 cm, com vascularização ao Doppler colorido (GE HEALTHCARE, modelo Logic 3).

Durante todo o tratamento estabelecido (carboplatina e firocoxibe), o proprietário relatou melhora clínica quanto à disúria e hematúria e não revelou nenhum efeito colateral pós-quimioterapia. Entretanto, na imagem ultrassonográfica não foi observada nenhuma alteração significativa. Ainda como exame complementar realizou-se uma urografia excretora associada à tomográfica computadorizada, visibilizando-se rins de topografia, dimensões e contornos preservados, parênquima renal apresentando espessura preservada e normoexcretantes, com ausência de dilatações pielocaliciais ou cálculos. Ureteres simétricos, medindo 0,3 mm de diâmetro na região de inserção no trígono, sem sinais de dilatação por processo obstrutivo. Discreta diminuição de diâmetro do ureter esquerdo dorsalmente à vesícula urinária. A mesma estava preenchida parcialmente por meio de contraste, evidenciando uma massa de contornos irregulares na região de trígono com moderada captação de contraste, medindo cerca de 3,6 cm (dorsoventral) x 2,9 cm (laterolateral) x 3,6 cm (craniocaudal), sendo sugestivo de neoplasia nesta região. Após dois meses do atendimento inicial foi realizada cistotomia e ressecção do tumor.

Realizou-se uma laparotomia mediana retro-umbilical, com incisão vesical na sua face ventral para visualização e inspeção da massa. Os ureteres foram avaliados por meio de sondagem (sonda uretral nº 4) e preservados (figura 1). A massa foi removida, retirando-se as camadas mucosa e muscular, mantendo-se a camada serosa, com perda parcial do esfíncter vesical interno. A sutura da bexiga foi realizada em dois planos invaginantes (Cushing e Shimieden), com fio absorvível Poliglactina 910 / nº 3-0. A cavidade abdominal foi suturada rotineiramente com fio de náilon 2-0. Uma sonda urinária (sonda uretral nº 08) de espera foi mantida no paciente.

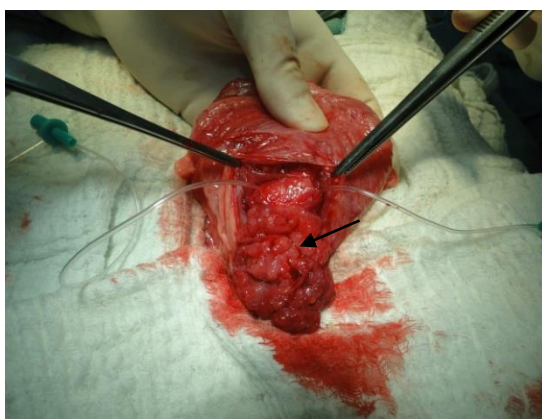


Figura 1. Leiomiossarcoma vesical em um cão. Localização da massa (seta), sondagem dos ureteres.

O material coletado foi enviado para análise histopatológica, tendo como diagnóstico definitivo o leiomiossarcoma com padrão misto: células fusiformes e epitelióides, ulcerado.

No período pós-operatório foram prescritos Amoxicilina (22mg/kg/BID/VO), Meloxicam (0,1mg/kg/SID/VO) e Dipirona (25mg/kg/TID/VO), além da limpeza dos pontos com solução fisiológica e solução de digluconato de clorexidina (Merthiolate spray® /TID/ANR).

O primeiro retorno foi realizado após 3 dias, no qual o proprietário referiu ótimo estado geral, normorexia, normodipsia, normoquesia e micção com discreta quantidade de sangue. Ao exame físico não foi observada alteração digna de nota. No oitavo dia do pós-operatório observou-se ótimo estado geral e urina de coloração e quantidade normais. A sonda de espera foi removida. Após laudo histopatológico (leiomiossarcoma), foi sugerida nova intervenção cirúrgica para remoção adicional de margens de segurança, bem como novo protocolo quimioterápico. O proprietário optou por não realizar nenhum dos tratamentos propostos. Após 6 meses do tratamento cirúrgico proprietário foi contactado e referiu ótimo estado geral, sem nenhuma queixa quanto à disúria e hematúria.

DISCUSSÃO

Observa-se que os relatos de cães com leiomiossarcoma vesical são raros, diferenciando, portanto do que é descrito na literatura médica (8). Parekh et al. (8) descreveram 192 casos de pacientes humanos apresentando neoplasia vesical, sendo 50% diagnosticados como leiomiossarcoma.

O leiomiossarcoma é uma neoplasia comum do trato gastrointestinal, como relatado por Kapatkin et al. (9), em um estudo com 44 animais diagnosticados com leiomiossarcoma, sendo 13 deles no estômago ou intestino delgado, 10 no ceco, 16 no baço e 5 no fígado. A localização deste tipo tumoral em vesícula urinária, como é o caso do presente estudo, tem escassos relatos na literatura.

A idade média de cães com leiomiossarcoma na vesícula urinária é de sete anos, mas Takada et al. (2) relataram o caso de um cão de 3 anos idade, tratando-se de um animal jovem, semelhante ao presente relato. Assim como observado na literatura (3), o presente caso trata-se de animal fêmea.

Os exames laboratoriais (hemograma e bioquímicos) não foram conclusivos, ou seja, específicos, de acordo com os dados reportados por Morris e Dobson (6), e Chun e Garret (10).

O exame microbiológico negativo auxiliou na exclusão do diagnóstico de hematúria relacionada à cistite bacteriana. A citologia também contribuiu para o diagnóstico de neoplasia vesical, apesar da divergência no diagnóstico do tipo tumoral diferente do exame histopatológico, sendo este definitivo e fundamental para o diagnóstico.

O exame ultrassonográfico e a tomografia computadorizada foram importantes para a delimitação da massa e verificação da ausência de acometimento dos ureteres e envolvimento da uretra proximal, similar ao descrito por Frost et al. (11), os quais concluíram que a ultrassonografia é a primeira técnica de diagnóstico por imagem indicada para pacientes que apresentem hematúria e disúria, além de importante método de avaliação de animais com suspeita de neoplasia. A técnica de Doppler colorido demonstrou a hipervascularização, que detecta a neoangiogênese tumoral e auxilia na confirmação de tumores vesicais, principalmente na diferenciação dos coágulos aderidos na parede da bexiga (11).

O protocolo quimioterápico (carboplatina e firocoxibe) foi adotado considerando-se o laudo citológico de neoplasia epitelial. A carboplatina foi escolhida ao invés da cisplatina, por apresentar menos efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, náuseas, vômitos, ototoxicidade, alopecia, reações semelhantes à anafilaxia e neurotoxicidade (12). O firocoxibe, por ser capaz de inibir de forma seletiva a enzima ciclooxigenase 2, promovendo máximo controle da inflamação e possui menor potencial ulcerogênico e nefrotóxico em relação aos anti-inflamatórios não seletivos (13). A associação de anti-inflamatórios com agentes antineoplásicos pode ser para muitos tumores, a opção terapêutica com melhores resultados.

Durante o tratamento quimioterápico foi observada uma discreta leucopenia com neutropenia, reação possível considerando-se que a carboplatina pode causar mielossupressão,

sendo os neutrófilos e as plaquetas as linhagens mais comumente afetadas, com Nadir (efeito deteriorante máximo) ocorrendo 11 a 14 dias após a administração (12).

Assim como citado na literatura a ressecção cirúrgica da massa é a opção terapêutica mais indicada para casos de neoplasia vesical, sendo a cistectomia parcial ou total indicada em alguns tipos tumorais, uma vez que pode ser necessária a retirada de tecidos mais profundos (1,3). Uma nova intervenção cirúrgica radical associada à quimioterapia promoveria melhor prognóstico para o animal, e apesar da não aceitação pelo proprietário desta nova proposta terapêutica, observou-se uma melhora da qualidade de vida do paciente após a retirada da massa.

CONCLUSÃO

O leiomiossarcoma é uma neoplasia incomum na vesícula urinária de cães, especialmente considerando cães adultos jovens. A urografia excretora foi importante para avaliação do acometimento dos ureteres e esfíncter vesical interno, e quando associada à tomografia computadorizada, a análise foi mais precisa. A ressecção cirúrgica permitiu avaliação completa da massa e o exame histopatológico contribuiu significativamente para o diagnóstico definitivo e determinação do prognóstico. A cistectomia parcial é o tratamento cirúrgico indicado e necessário uma vez que é preciso retirar toda camada muscular acometida.

REFERÊNCIAS

1. Fossum TW. Cirurgia de pequenos animais. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
2. Takada M, D'Angelino RHR, Nishiya AT, Ferrari TM, Sanchez MP, Braconaro P, et al. Leiomiossarcoma vesical em cão: relato de caso. *Acta Sci Vet.* 2007;35:1379-80.
3. Daleck CR, Barboza A, Rodalki S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca; 2008.
4. Matheus WE. Câncer de bexiga: PTa, PTis e PT1. In: Nardoza Júnior A, Reis RB, Campos RSM. Manual de urologia. São Paulo: Planmark; 2010. p.55-62.
5. Knapp DW. Tumor of the urinary system. In: Withrow SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.490-9.
6. Morris J, Dobson J. Oncologia em pequenos animais. São Paulo: Roca; 2007.
7. Klein MK. Tumors of the female reproductive system. In Withrow, S.E., Macewen, E.G. and MacEwan, E.G. Small Animal Clinical Oncology. 3.ed. Wisconsin: Elsevier Health Sciences, pp. 490-499.
8. Parekh DJ, Jung C, O'Conner J, Dutra S, Smith ER. Leiomyosarcoma in urinary bladder after cyclophosphamide therapy for retinoblastoma and review of bladder sarcomas. *Urology.* 2002;60:164.
9. Kapatkin AS, Mullen HS, Matthiesen DT, Patnaik AK. Leiomyosarcoma in dogs: 44 cases(1983-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:1077-9.
10. Chun R, Garret L. Urogenital and mammary gland tumors. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p.784-9.

11. Frost TR, Iwasaki M, Campos AG, Torres LN, Dagli MLZ. Avaliação ultrasonográfica e pelo Doppler colorido, do carcinoma de células transicionais da bexiga em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59:1400-7.
12. Ogilvie GK. Chemotherapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1996. p.70-86.
13. Tasaka AC. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: Spinosa HS, Górnias SL, Bernardi MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.256-72.

Recebido em: 20/05/2015

Aceito em: 12/06/2016

SENSORY ATTRIBUTES OF VEAL MEAT RECEIVING DIFFERENT LIQUID DIETS¹

Patrícia de Oliveira Lima²
Leds Lene dos Santos Araujo
Renata Nayhara de Lima
Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis
Antonia Lucivânia de Sousa Monte
Kátia Tatiana de Lima Lopes
Ana Paula Pinheiro de Assis
Salenilda Soares Firmino

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the sensory quality of meat from crossbred calves slaughtered at 60 days old. We used 16 crossbred calves (Holstein x Zebu), distributed in a completely randomized design with four treatments and four replications: LI - Whole milk, LS - 50% whole milk + 50% cheese whey; LSO - LS added one whole egg ; LSOB - LSO added biotin. After slaughter at 60 days, samples of the *Longissimus dorsi* muscle were collected to perform the sensory analysis as the global acceptance, color acceptance and intensity of flavor, tenderness and succulence. Data were submitted to ANOVA and Tukey's test. The samples received scores averaging around 6.0, corresponding to "liked little" in hedonic scale, in relation to global acceptance and acceptance of color, no significant influence of liquid diets ($P>0.05$). The same occurred with respect to the quality attributes of beef, which was considered average intensity of flavor, very tender and slightly succulent. It was concluded that the diet offered to the animals did not influence the acceptability and quality of veal meat.

Keywords: color, flavor, global acceptance, succulence, tenderness.

ATRIBUTOS SENSORIAIS DA CARNE DE VITelo RECEBENDO DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade sensorial da carne de bezerros leiteiros mestiços abatidos aos 60 dias. Foram utilizados 16 bezerros mestiços (holandês x zebu), distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições: LI - Leite integral; LS - 50% Leite integral + 50% de Soro de queijo fresco; LSO - LS adicionado de um ovo integral; LSOB - LSO adicionado de biotina. Após o abate aos 60 dias, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para a realização da análise sensorial quanto à aceitação global, aceitação da cor e intensidade dos atributos sabor, maciez e suculência. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. As amostras receberam escores com médias em torno de 6,0, correspondente a "gostei pouco" da escala hedônica, em relação à aceitação global e aceitação da cor, sem influência significativa das dietas líquidas ($P>0,05$). O mesmo ocorreu com relação aos atributos de qualidade da carne, que foi considerada com sabor de média intensidade, bem macia e pouco succulenta. As dietas

¹ Pesquisa financiada pelo BNB/FUNDECI/ETENE.

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Contato principal para correspondência, 59625-900 - Mossoró, RN – Brasil.

testadas não influenciaram as características sensoriais da carne de bezerros mestiços abatidos aos 60 dias de idade.

Palavras-chave: aceitação global, cor, maciez, sabor, suculência.

ATRIBUTOS SENSORIALES DE CARNE DE TERNERA RECIBIENDO DIFERENTES DIETAS LIQUIDAS

RESÚMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad de la carne sensorial de terneros mestizos sacrificadas a los 60 días. Utilizamos 16 terneros mestizos (Holstein x Cebú), distribuidos en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones: LI - leche; LS - 50% suero de queso + 50% leche; LSO - LS añade un huevo; LSOB - LSO añadió biotina. Después del masacre a los 60 días, se colectaron muestras de músculo Longissimus dorsi para llevar a cabo el análisis sensorial como la aceptación global, la aceptación del color y la intensidad de los atributos de sabor, tiernesa y jugosidad. Los datos fueron sometidos a la prueba de ANOVA y Tukey. Las muestras recibieron calificaciones promedio de alrededor de 6,0, lo que corresponde a "como poco" la escala hedónica, en la aceptación general y la aceptación de color, ninguna influencia significativa de distas netos ($P > 0,05$). Lo mismo ocurrió con respecto a los atributos de calidad de la carne, que fue considerada mediana intensidad de sabor, muy tierna y ligeramente succulenta. Las dietas probadas no afectaron las características sensoriales de la carne de terneros cruzados sacrificados a los 60 días de edad.

Palabras clave: aceptación global, color, jugosidad, sabor, ternura.

INTRODUCTION

In countries with developed dairy farming, such as in Europe and North America, the use of calves from dairy herd for beef production is a reality, which represents a significant portion of the meat consumed by the population. In the last 30 to 40 years, the abundance of male calves from dairy herds in these countries has encouraged dairy farmers to produce veal meat (1). The calf can be characterized according to the feeding system, that is, exclusively from milk and milk substitute to slaughter, for the production of white meat or milk feeding and thereafter the concentrate and hay, containing minimum amounts of iron in the diet, for the production of pink meat calf (2). Veal meat presents a good choice, as it meets the requirement of quality and healthy products, beyond the new standards of creation within the standards of animal welfare (3). Veal meat is practically free from fat cover, and is soft, with moderate marbling (4), which classifies it as a meat "light", noble and healthy (5). However, there is little research with the aim of demonstrating this potential, in particular that related to meat quality.

Meat quality is a combination of elements, such as flavor, succulence, texture, softness and appearance, which contribute to the assessment of the product by the consumer, whose satisfaction depends on the psychological and sensory responses related to each individual (6). Sensory analysis is a powerful tool to evaluate attributes that cannot be measured objectively with instrumental analyzes, such as acceptance and flavor, and aspects related to texture, such as softness and succulence, in which human perception is more complete. Several techniques can be used for sensory analysis, including those that measure the acceptance by the consumer, or others that are only descriptive in nature (7).

Although much of the Brazilian herd consists of crossbred animals, with a potential for the production of calves, few are utilized for this purpose in order to reduce spending.

According to Lima et al. (8) one of the ways to reduce the cost of the feeding system on milk production is monitoring the age at weaning and reducing the amount of milk supplied, or by partial or total substitution of whole milk by a milk substitute (milk replacer), which is generally a byproduct of the dairy industry.

Few studies have reported aspects of the quality characteristics of veal meat. Thus, the present study aimed to evaluate the sensory quality of meat from crossbred calves slaughtered at 60 days old.

MATERIAL AND METHODS

For the purpose of this study, 16 crossbred calves (Holstein x Zebu) from the dairy herds in the region were selected. The selected calves belonged to the zebu breed, which originated from crosses of breeds such as Guzerat, Red Sindhi and Gir, whose composition is unknown. The animals were distributed in a completely randomized design with four treatments (diets) and four repetitions: LI: Whole milk (control); LS: 50% whole milk + 50% whey cheese; LSO: LS added one whole egg; LSOB: LSO added the biotin (0.5 mg/animal/day).

At 60 days of age, the calves were slaughtered, and the *Longissimus dorsi* muscle was collected, and subsequently, this material was frozen for about 45 days until the analyzes were performed. The sensory tests were performed in the Sensory Analysis Laboratory of Embrapa Tropical, in Fortaleza - CE - Brasil, in individual booths, under conditions of controlled temperature and lighting, according to the methodology proposed by Nassu (9).

The samples were then carefully removed from the *Longissimus dorsi* muscle in the direction parallel to the orientation of the muscle fibers, using a circular cutter of 1.27 cm diameter. Each sample measured approximately 1.0 x 1.0 x 2.5 cm. The samples were subjected to a heat treatment in an electric furnace at a temperature of 180 ° C, 71 ° C up to the geometrical center, controlled by a thermometer (Delta ohm, model HD9218). The samples, after removal from the oven, were kept in a heater at a temperature of 50 ° C until assessment. Each judge received a sample of each diet, a total of four samples on paper plates, coded with three digit random numbers. Further, each judge was also served water and a slice of bread, which was used as a neutralizer between the samples for cleaning the taste buds. The order of presentation of samples was balanced to avoid changes in the results (10). The team of judges, which consisted of 48 individuals, was recruited for the present study on the basis of their liking and eating habits of beef.

The overall acceptance and acceptance of color of the samples were evaluated using the hedonic scale of nine points (11), ranging from like extremely to dislike extremely. Further, the intensity of flavor, softness and succulence were also included in the same evaluation form (12) using structured linear scales of 7 (seven) points. Herein, the amateur judges marked scores for these quality parameters of beef, which were converted into numerical values for the purpose of statistical analysis.

Data were submitted for analysis by ANOVA and the Tukey's test to compare the means, using the procedures available in the statistical package SAS, and presented in the form of histograms.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the mean values converted from the hedonic structured scale assigned by the judges to the samples of meat from crossbred calves slaughtered at 60 days old. It is observed that all samples received scores averaging around 6.0, corresponding to "liked little" on the hedonic scale, in relation to global acceptance and color.

Table 1. Average values converted from the hedonic scale given by the panelists for the sensory attributes of veal calves.

| Variable | Liquid diets | | | | SE |
|-------------------|--------------|------|------|------|--------|
| | LI | LS | LSO | LSOB | |
| Global Acceptance | 6.2a | 5.8a | 6.0a | 6.8a | ± 0.12 |
| Color Acceptance | 5.9a | 5.8a | 5.7a | 5.7a | ± 0.12 |

Means followed by different letters in the same line differ ($P < 0.05$) by the Tukey test; SE: Standard error; LI: Whole milk; LS: 50% whole milk + 50% whey cheese; LSO: LS added one whole egg; LSOB: LSO added biotin.

The above response of the judges may be justified by the likely comparison of veal with meat of adult bovine animals fit for slaughter (about 450 to 500kg), as the consumption of veal is not part of the eating habits of Brazilians. It is worth noting, with regards to the color, that the slaughter of calves at 60 days of age resulted in a light-colored meat (classified in Europe as white veal meat), not showing the characteristic color of beef obtained from adult animals generally consumed by the population.

Although no statistically significant difference was detected between the mean values converted from the hedonic scale (Table 1), minor differences in the distribution of frequencies in each category of the scale hedonic were observed by analyzing the histograms (Figures 1 and 2). Figure 2 depicts that about 70% of the judges have given values 6 and 7 to all the samples of veal meat, which corresponded to "like little" and "like". However, if an imaginary line is drawn on the bars for each sample, it can be observed that the frequency distribution of responses for the sample LSOB (added dietary biotin) differs slightly from others, being shifted to the lower region of acceptability of the scale.

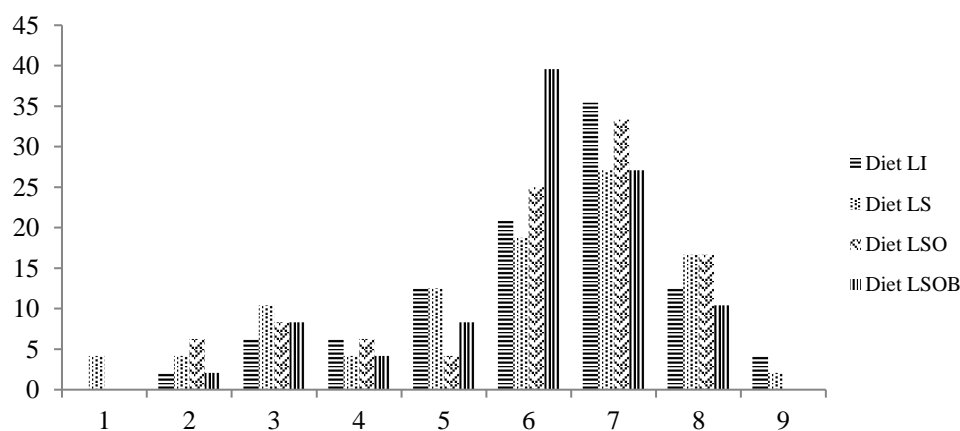


Figure 1. Histograms of the frequency of hedonic values assigned to the overall acceptance of samples from different treatments (LI, LS, LSO and LSOB) of meat from calves slaughtered at 60 days of age (1 = dislike extremely and 9 = like extremely).

In a similar manner, it can be observed in Figure 2 that the samples of meat from calves fed on diets LI and LSO had frequency distributions more displaced to the region of greater acceptance of the scale, indicating that these samples were more acceptable in relation to color.

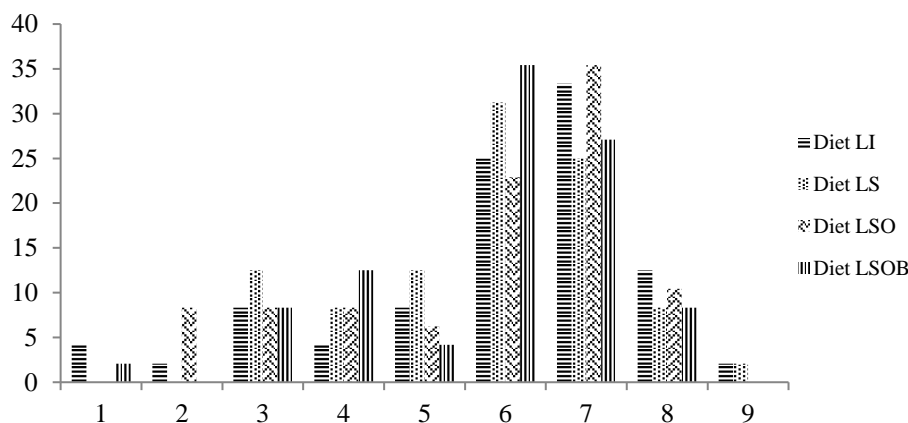


Figure 2. Histograms of the frequency of hedonic values assigned to the acceptance of color samples of different treatments (LI, LS, LSO and LSOB) of meat from calves slaughtered at 60 days of age (1 = dislike extremely and 9 = like extremely).

Table 2 presents the average values of the responses to the intensity of the flavor of meat, succulence and softness. It can be observed that there were no significant differences ($P > 0.05$) between the diets for any of the attributes of meat quality. According to these averages, the calf meat of all the treatments were considered of medium intensity on a scale of the meat flavor (near the middle of the scale, neither weak nor strong), very soft and a bit succulent.

Table 2. Averages assigned by the judges for flavor, softness and succulence of meat from calves slaughtered at 60 days.

| Variable | Liquid Diets | | | | SE |
|------------|--------------|------|------|------|------|
| | LI | LS | LSO | LSOB | |
| Flavor | 3.6a | 3.3a | 3.5a | 3.4a | 0.14 |
| Softness | 5.4a | 5.2a | 5.2a | 4.9a | 0.13 |
| Succulence | 3.7a | 3.3a | 3.5a | 3.6a | 0.14 |

Means followed by different letters in the same line differ ($P < 0.05$) by the Tukey test; SE: Standard error; LI: Whole milk; LS: 50% whole milk + 50% whey cheese; LSO: LS added one whole egg; LSOB: LSO added biotin.

The frequency distribution of responses on a scale of intensity of flavor of the meat is shown in Figure 3. It can be seen that there was a segmentation of the sensory panel, as about 50% of the consumers responded in the categories on the "weak" in scale (categories 1-3) and an average of 18% replied in the middle of the scale (category 4), corresponding to "neither weak nor strong" and another 25 to 36% found the taste of meat to be a bit too strong (categories 5-7).

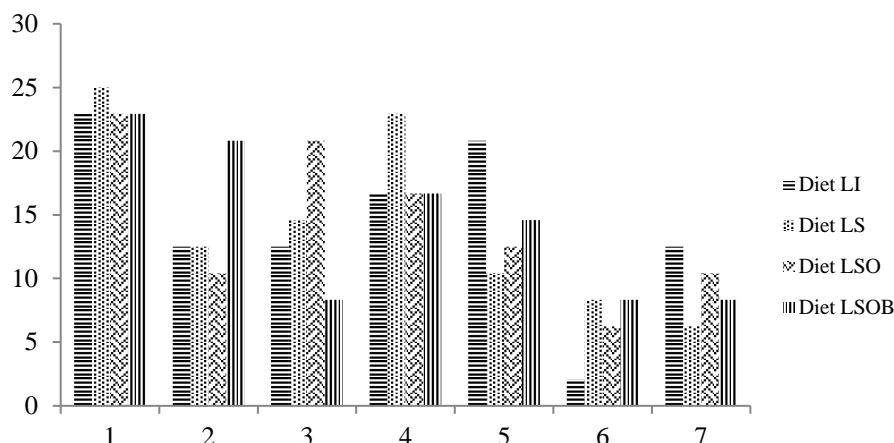


Figure 3. Histograms of the frequency of values attributed to the intensity of the flavor of the meat samples of different treatments (LI, LS, LSO and LSOB) of meat from calves slaughtered at 60 days of age (1 = very low, 7 = very strong).

It can be noted that in Brazil there is no significant consumption of white meat calves, slaughtered as in the present study, owing to little or no market demand, possibly due to cultural issues. Thus, only a few studies related to the characteristics of the meat calves have been conducted, there by making it difficult to establish a standard for such product. However, since then, a vast field of research has been opened up.

There was no statistically significant difference between the averages, with regards to the softness. However, minor differences were observed between treatments in the frequency distribution of responses on the scale of intensity (Figure 4). The meat sample LI diet showed 77% of responses in categories 5-7, corresponding to the positive reaction of softness of the sample, against 67% of there maining samples. In addition, the diet LSOB showed only 23% of responses in category 7 ("very soft"), while samples from the other diets showed 33 to 37% of responses in this category.

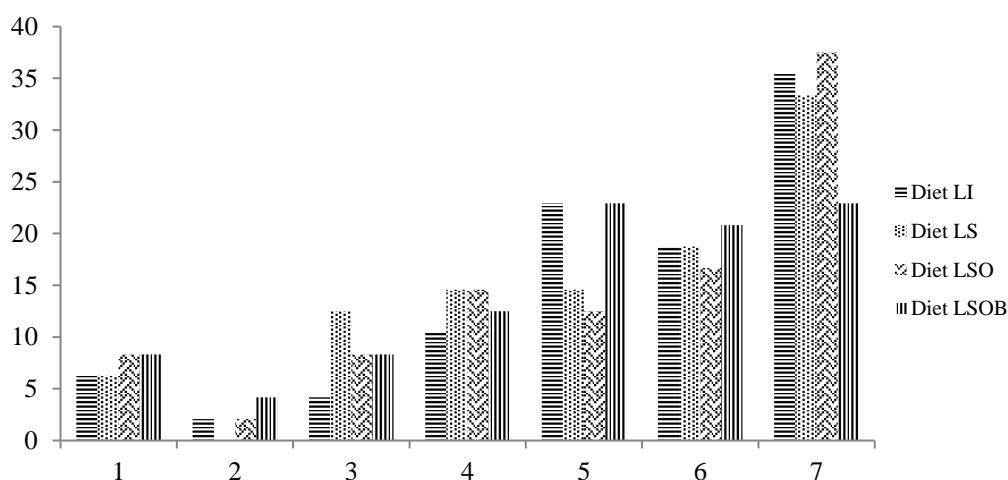


Figure 4. Histograms of the frequency of values attributed to the intensity of the softness of the meat samples from different treatments (LI, LS, LSO and LSOB) of calves slaughtered at 60 days of age (1 = not soft, 7 = very soft).

Arboitte et al. (13) studied the physical carcass composition, meat quality and cholesterol content in the *Longissimus dorsi* muscle of steers 5/8 Nellore - 3/8 Charolais steers feed lot that were finished and slaughtered at different maturity stages. The results established that certain softness of the meat shear force obtained by the method of Warner-

Bratzler, was not influenced by the slaughter age (mean of 3.78 kgf), which was similar to that seen in the tenderness evaluated by the judges, being ranked among above average (6 points) and very soft (8 dots) on the same scale used in this study. The highest score in terms of softness was obtained for the meat of animals slaughtered at 425 kg, 7.17 points, which was considered as soft meat.

Lawrie (14) demonstrated that under the same conditions of cooking the meat of young cattle was more tender than the meat of adult animals. The reason for the tenderness was that the collagen in the young beef of animals solubilizes quickly, forming a gel on cooling, while the collagen of adult animals becomes sparingly soluble and hardens the meat.

In the present study, the softness revealed in the meat was expected as it was obtained from animals slaughtered at 60 days. Therefore, the individuals were still in the growth stage and were physiologically immature. In addition, the animals were raised in confinement, in individual shelters, which limited the movements, thereby reducing the physical activity and resulting in greater rigidity to the muscles.

Figure 5 shows the results for the succulence. The histogram confirms the results presented in Table 2, where it was observed that the meat samples of all the treatments showed little succulence. There is a higher percentage of responses on a point scale ("no juicy"). However, the sample of the diet LI had frequency distributions more displaced to the region of higher succulence of the scale, indicating that this sample had slightly more succulence in comparison to others.

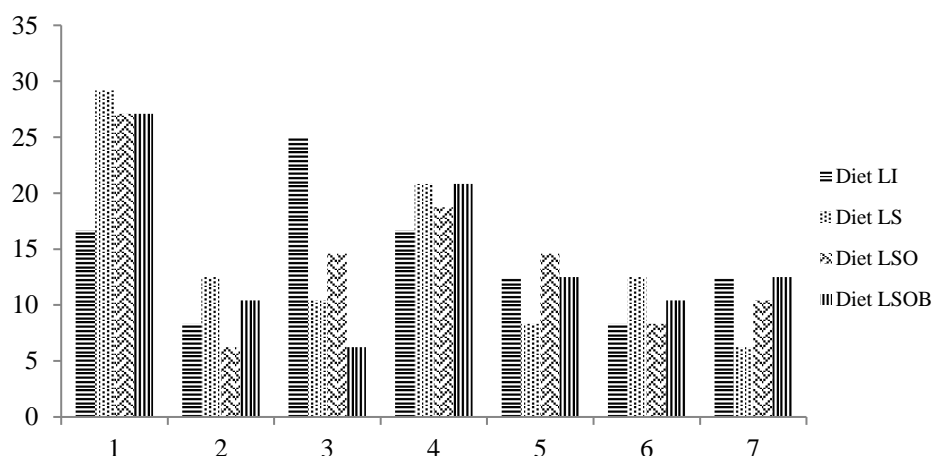


Figure 5. Histograms of the frequency of values assigned to the intensity of succulence of the meat samples of different treatments (LI, LS, LSO and LSOB) of calves slaughtered at 60 days of age (1 = not succulent, 7 = very succulent).

Pacheco et al. (15) evaluated the characteristic of succulence and established that the meat of steers slaughtered at 15 months and ranked among "succulent" and "very succulent" (7.34 points) was significantly higher in comparison to the flesh of young animals slaughtered at 22 months and ranked among "slightly above average" and "succulent" (6.83 points). The main causes of succulence are the water and fat released during chewing, which have a stimulating effect on the salivation.

During the growth phase of the animal, the fat tissue, which has delayed development but is deposited at all ages owing to the intake of nutrients, in particular energy, exceeds the requirement for maintenance and growth (16).

The fat marbling is the last to be deposited in the muscle and is affected by the dietary energy level as well as the weight of the animal. In general, the sensory characteristics of the meat were found to be correlated positively among themselves, there by indicating that the meat was also considered soft, succulent and palatable, as reported by Arboitte et al. (13).

Owing to the age of slaughter adopted in the present study as 60 days old, the carcasses had obtained virtually no fat, marbling or subcutaneous, as the animals had not completed their growth, there by resulting in poorly developed muscle bundles. Thus, the responses of the panelists were mostly (65% in LI, 71% in LS, 60% and 61% in the LSO LSOB) less than four grades in the intensity scale for succulence, corresponding to "neither dry nor succulent".

CONCLUSIONS

The meat of the crossbred calves slaughtered at 60 days olds showed good acceptability in relation to its color and global aspects, and is considered by consumers as being a product of average meat flavor, soft but somewhat succulent.

It was concluded that the diet offered to the animals did not influence the acceptability and quality of veal meat.

ETHICS COMMITTEE AND BIOSAFETY

Protocol n. 147/2009 – CEUA/UNESP.

REFERENCES

1. Santos JPV, Ferreira CLLF. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. *Rev Inst Lact Cândido Torres*. 2001;56(321):44-50.
2. Lucci CS. *Bovinos leiteiros jovens*. São Paulo: Nobel; 1989.
3. Toledo R. Vitelo tropical: bom para o produtor e consumidor [Internet]. Curitiba; 2002 [cited 2014 Jan 16]. Available from: http://www.pr.gov.br/iapar/download/ni10_01_vitelo%20tropical.doc.
4. Roma Junior LC, Savastano Junior H, Martello LS, Leme PR, Pinheiro MG. Produção de vitelos a partir de bezerros leiteiros mestiços e da raça Holandesa. *Rev Bras Zootec*. 2008;37(6):1088-93.
5. Caldas F. Vitelo: opção de ganho na exploração leiteira. *Balde Branco*. 2003;38(461):36-40.
6. Tonetto CJ, Pires CC, Müller L, Rocha MG, Silva JHS, Frescura RBM, et al. Rendimentos de cortes da carcaça, características da carne e componentes do peso vivo em cordeiros terminados em três sistemas de alimentação. *Rev Bras Zootec*. 2004;33(1):234-41.
7. Nassu RT, Bernardi MRV, Borba H, Tullio RR, Cruz GM. Metodologia científica: protocolo para avaliação sensorial de carne bovina. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2009. (Comunicado Técnico / Embrapa Pecuária Sudeste; 92).
8. Lima PO, Moura AA, Façanha DAE, Guilhermino MM. Desempenho e indicadores de estresse térmico em bezerras alimentadas com sucedâneo lácteo com ou sem probiótico no Semiárido Brasileiro. *Arch Latinoam Prod Anim*. 2006;14(2):49-55.
9. Nassu RT. Análise sensorial de carne: conceitos e recomendações. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2007. (Comunicado Técnico / Embrapa Pecuária Sudeste; 79).

10. Macfie HJ, Bratchell N, Greenhoff K, Vallis LV. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *J Sens Stud.* 1989;4(2):129-48.
11. Peryam DR, Pilgrim FJ. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technol.* 1957;11(9):9-14.
12. Meilgaard MR, Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. Boca raton: CRC Press; 1987.
13. Arboitte MZ, Restle J, Alves Filho DC, Brondani IL, Pacheco OS, Menezes LFG, et al. Composição física da carcaça, qualidade da carne e conteúdo de colesterol no músculo *Longissimus dorsi* de novilhos 5/8 Nelore - 3/8 Charolês terminados em confinamento e abatidos em diferentes estádios de maturidade. *Rev Bras Zootec.* 2004;33(4):959-68.
14. Lawrie RA. Ciência da Carne. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
15. Pacheco PS, Restle J, Silva JHS, Brondani IL, Pascoal LL, Alves Filho DC, et al. Composição física da carcaça e qualidade da carne de novilhos jovens e superjovens de diferentes grupos genéticos. *Rev Bras Zootec.* 2005;34(5):1691-703.
16. Boggs DL, Merkel RA. Live animal: carcass evaluation and selection manual. Iowa: Michigan State University; 1981.

Recebido em: 02/08/2015

Aceito em: 01/06/2016

SOROPREVALÊNCIA E PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM FELÍDEOS SELVAGENS PROCEDENTES DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Carolina Costa Silva¹
André Marcelo Conceição Meneses¹
Carla Cristina Guimarães de Moraes¹
Ediclei Lima do Carmo²
Hélio Langoni³
Rodrigo Costa da Silva³
Helena Muta Hotta Pancieri¹
Bruno Rocha Martins¹
Nazaré Fonseca de Souza⁴

RESUMO

A toxoplasmose, uma das zoonoses mais difundidas no mundo, causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*, é capaz de infectar inúmeras espécies animais, dentre as quais os felídeos, que são os hospedeiros definitivos. O objetivo deste estudo foi determinar a soropositividade da toxoplasmose em felídeos silvestres mantidos em cativeiro em Capitão Poço e Belém, Pará. Foram pesquisadas 21 amostras de soro de quatro espécies de felídeos selvagens: *Herpailurus yaguarondi* (2) (gato-mourisco), *Leopardus pardalis* (7) (jagatirica), *L. wiedii* (1) (gato-maracajá) e *Panthera onca* (11) (onça-pintada e preta) pelos métodos sorológicos de hemaglutinação indireta (HAI) e aglutinação direta modificada (MAT). Além da sorologia, foram realizados também exames coproparasitológicos para a pesquisa de oocistos. Das amostras analisadas, 18 (85,7%) foram positivas, sendo 12 amostras (57,1%) soropositivas pela técnica HAI e 14 amostras (66,7%) pela MAT. A concordância entre as duas técnicas foi nula. No gênero *Herpailurus* um dos animais foi negativo para a HAI e positivos para a técnica MAT e o outro positivo para HAI e negativo para MAT. Para o gênero *Leopardus*, 50% (4 de 8) de positivos na HAI e 75% (6/8) na MAT e *Panthera*, 63,64% (7 de 11) nas duas técnicas. A titulação mais alta foi verificada em um gato-maracajá (1024), na MAT. Não foi encontrado oocisto de *T. gondii* nas fezes de nenhum dos animais estudados. Desse modo, observou-se uma alta ocorrência de anticorpos anti-toxoplasma nos municípios estudados e que a técnica utilizada pode interferir no diagnóstico sorológico da doença.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, felídeos, sorologia, oocistos.

SEROPREVALENCE AND RESEARCH OF OOCYSTS *Toxoplasma gondii* IN WILD FELINES FROM PARA STATE, BRAZIL

ABSTRACT

The toxoplasmosis, one of the most widespread zoonoses in the world, caused by intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* is able to infect many animal species, among which the felidae are the only definitive hosts. The aim of this study was to determine the seroprevalence of toxoplasmosis in wild felidae kept in captivity in two municipalities of the state of Pará. It were used 21 serum samples from four species of wild felidae: *Herpailurus yaguarondi* (2)

¹ Universidade Federal do Pará, Contato principal para correspondência: carolsvet@hotmail.com.

² Instituto Evandro Chagas

³ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia

(Jaguarundi), *Leopardus pardalis* (7) (Ocelot), *L. wiedii* (1) (Margay) and *Panthera onca* (11) (Jaguar) who were assessed by serological methods of indirect hemagglutination (IHA) and modified direct agglutination test (MAT). Besides serology, were also conducted coproparasitologic tests to detect possible oocysts present in their faeces. Among the samples analyzed, 18 (85.7%) were positive. Twelve (57.1%) animals were seropositive by the IHA technique and 14 (66.7%) by MAT technique. The concordance between both techniques was null. One animal of the *Herpailurus* was negative in IHA and positive in MAT and the other was positive in IHA and negative in MAT, in *Leopardus*, 50% and 75% animals were positive in IHA and in MAT, and in the *Panthera*, 63.64% in both techniques. Higher titers were obtained from a margay (1024) by MAT. No oocysts of *T. gondii* were found in the feces of any animal studied. It was found that there is a high occurrence of toxoplasmosis in the cities studied and that the chosen technique can affect the serological diagnosis of the disease.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, felidae, serology, oocysts.

SEROPREVALENCIA Y BÚSQUEDA DE OOQUISTES DE *Toxoplasma gondii* EN FELINOS SILVESTRES EN EL ESTADO DE PARÁ, BRASIL

RESUMEN

La toxoplasmosis, una de las zoonosis más extendida en el mundo, causada por *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular que es capaz de infectar a muchas especies animales, entre los felinos, que son los únicos hospedadores definitivos. El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de la toxoplasmosis en felinos silvestres en cautividad en dos municipios del estado de Pará. Se utilizaron 21 muestras de suero de cuatro especies de felinos silvestres: *Herpailurus yaguarondi* (Yaguarundi), *Leopardus pardalis* (Ocelote), *L. wiedii* (Tigrillo) y *Panthera onca* (Yaguar) que fueron evaluados por métodos serológicos de hemaglutinación indirecta (HAI) y modificado prueba de aglutinación directa (MAT). Además de las pruebas serológicas, también se realizaron pruebas coproparasitológicas para detectar posibles ooquistes presentes en las heces. De las muestras analizadas, 18 (85,7%) fueron positivas. Doce (57,1%) fueron los animales seropositivos por la técnica de HAI y 14 (66,7%) por técnica de MAT. La concordancia entre las dos técnicas fue nula. En el género *Herpailurus*, uno de los animales fue negativo a técnica de HAI y positivo para MAT y el otro, positivo para HAI y negativo para MAT. En *Leopardus*, 50% fueran positivos en HAI y 75% en MAT, y el *Panthera*, 63,64% positivos en las dos técnicas. La valoración fue el más alto registrado en un tigrillo (1024), en MAT. No se encontraron ooquistes de *T. gondii* en las heces de cualquier animal estudiado. Se encontró que existe una alta prevalencia de la toxoplasmosis en las ciudades estudiadas y que la técnica utilizada puede interferir con el diagnóstico serológico de la enfermedad.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, felinos, serología, ooquistes.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das parasitoses mais comuns no mundo causada pelo *Toxoplasma gondii*, um parasito coccídeo intracelular obrigatório com distribuição mundial, caracterizado por Nicolle e Manceaux em 1909, pertencente ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidea (1).

O gato doméstico e outros felídeos são os hospedeiros definitivos e muitas espécies de vertebrados, inclusive o homem, podem servir como hospedeiros intermediários. A infecção

nos hospedeiros definitivos ou intermediários é bastante comum, no entanto, as manifestações clínicas evidenciadas, em geral são raras (2).

Inquéritos soropidemiológicos realizados em diferentes continentes demonstraram que a toxoplasmose é uma infecção de ocorrência mundial, com prevalência bastante variada de acordo com cada região investigada. É considerada uma das zoonoses mais difundidas no planeta, com importância médica e veterinária (3).

Considera-se que as três principais formas de transmissão do *T. gondii* ocorrem pela ingestão de oocistos esporulados (eliminados pelos felídeos, que contaminam o solo, os alimentos e a água), pelo consumo de carnes e/ou vísceras cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais e pela via transplacentária (4).

Os felídeos são o ponto-chave da epidemiologia da toxoplasmose, sendo os únicos hospedeiros da forma sexuada do parasita e, por eliminarem oocistos nas fezes, são a única fonte de infecção dos animais herbívoros (5) e, conseqüentemente, os responsáveis pela perpetuação da doença no meio ambiente e na cadeia alimentar (6).

Apesar dessa importância, pouco se sabe sobre o papel dos felídeos selvagens na epidemiologia natural da infecção do *T. gondii* e a importância deste como causa de morbidade e mortalidade nos felídeos selvagens (7).

Para o diagnóstico animal, os métodos mais utilizados são a aglutinação direta modificada (MAT), hemaglutinação indireta (HAI), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (8).

O *status* da toxoplasmose em felídeos selvagens, particularmente neotropicais, é pouco definido no Brasil e o papel de alguns desses animais no ciclo do *T. gondii* ainda não está totalmente esclarecido (9). Na região Amazônica, em especial no estado do Pará, as informações sobre a ocorrência de toxoplasmose em felídeos silvestres são bastante limitadas, assim, o referido estudo foi proposto com o objetivo de determinar a soropositividade para esta infecção em um grupo de felídeos silvestres mantidos em cativeiro em dois municípios paraenses.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em 2007 e 2008 no Parque Zoobotânico Dr. Adhemar Monteiro – Gavião Real, localizado no município de Capitão Poço-PA (-1° 44' 43.79", -47° 3' 57.10") e no 2° Batalhão de Infantaria de Selva – Batalhão Pedro Teixeira (2° BIS) (-1° 24' 56.08", -48° 26' 45.64"), respectivamente; com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis), sob o registro n.1990474.

Foram utilizados 21 felídeos selvagens nativos da fauna amazônica de espécie, sexo e idade variados. Desses, 19 animais habitavam o Parque Zoobotânico e dois, o 2° BIS.

Os animais foram contidos quimicamente com associação de cloridrato de quetamina (10mg/Kg – Cetamin[®], Cotia, Brasil) e cloridrato de xilazina (1mg/Kg – Rompum[®], São Paulo, Brasil), e, injetados diretamente, utilizando-se dardos lançados com auxílio de zarabatana.

As amostras de sangue foram coletadas, das veias jugulares, cefálicas ou femorais, conforme a conveniência. Após a obtenção dos soros, os mesmos foram acondicionados em tubos de polietileno (Eppendorf, São Paulo, Brasil), três alíquotas, armazenados sob refrigeração e transportados até o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

As amostras de fezes foram coletadas nos recintos, no momento em que os animais estavam anestesiados.

O teste de hemaglutinação indireta (HAI) foi realizado segundo as especificações do fabricante do *Kit Bio-Toxo*[®], no Laboratório de Toxoplasmose (Bioshop, Goiânia, Brasil), da Seção de Parasitologia (SAPAR) do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA. O resultado

foi considerado positivo quando havia formação de película (véu) cobrindo todo o orifício do poço e, negativo, com formação de botão compacto de hemácias no fundo da cavidade.

A técnica de aglutinação direta modificada (MAT) foi realizada no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses - NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, SP, conforme descrito por Desmonts e Remington (10). A amostra foi considerada negativa quando se observou a formação de um depósito da suspensão de parasitas, no fundo do poço em forma de botão bem definido; e, considerada positiva, quando se formou um tapete completo de organismos aglutinados.

O exame coproparasitológico foi possível em 18 dos 21 animais, e utilizaram-se três métodos: Willis ou flutuação espontânea (11); sedimentação espontânea (12); e, direto. A amostra seria considerada positiva caso fosse visualizado o parasito em qualquer uma das técnicas acima citadas.

Para a análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher para confrontar os diferentes gêneros com as duas técnicas sorológicas (HAI e MAT) e os testes de McNemar e índice Kappa para confrontar os resultados das técnicas sorológicas entre si (13) Todas as análises foram realizadas com o nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Dos 21 animais avaliados, oito eram do gênero *Leopardus*, sendo 62,5% (5/8) machos e 37,5% (3/8) fêmeas; dois, do gênero *Herpailurus*, sendo 50% (1/2) macho e 50% (1/2) fêmea; e, 11 do gênero *Panthera*, 36,4% (4/11) machos e 63,6% (7/11) fêmeas (Tabela 1). Obtiveram-se 12 (57,1%) amostras soropositivas pela técnica HAI, 14 (42,9%) pela técnica MAT e 8 (38,1%) em ambas as técnicas.

Tabela 1. Distribuição dos animais avaliados de acordo com a variável sexo, pertencentes ao Parque Zoológico Dr. Adhemar Monteiro – Gavião Real, Capitão Poço e ao 2º Batalhão de Infantaria de Selva (BIS), Belém, PA, 2008.

| Gêneros | Machos | | Fêmeas | | Total | |
|--------------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>Herpailurus</i> | 1 | 50,00 | 1 | 50,00 | 2 | 9,52 |
| <i>Leopardus</i> | 5 | 62,50 | 3 | 37,50 | 8 | 38,10 |
| <i>Panthera</i> | 4 | 36,36 | 7 | 63,64 | 11 | 52,38 |
| Total | 10 | 47,62 | 10 | 52,38 | 21 | 100,00 |

Os resultados segundo os gêneros estudados e os testes sorológicos, estão expressos nas tabelas 2, 3 e 4. Vale ressaltar a retirada da amostra do gênero *Herpailurus* nas Tabelas 2 e 3 devido a pouca representatividade. Com isso, os gêneros, em ambos os testes, tiveram $P > 0,05$, ou seja, não apresentaram diferença estatística significativa pelo teste exato de Fisher. O gênero *Herpailurus* apresentou 50% (um animal) de soropositividade pela HAI e 50% (um animal), pela MAT.

Tabela 2. Resultado da análise sorológica dos animais pertencentes ao Parque Zoobotânico Dr. Adhemar Monteiro – Gavião Real, Capitão Poço e ao 2º Batalhão de Infantaria de Selva (BIS), pela técnica Hemaglutinação Indireta (HAI), Belém, PA, 2008.

| Gêneros | Soropositivo | | Soronegativo | | Total | |
|------------------|--------------|-------|--------------|-------|-------|--------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>Leopardus</i> | 4 | 21,05 | 4 | 21,05 | 8 | 42,11 |
| <i>Panthera</i> | 7 | 36,84 | 4 | 21,05 | 11 | 57,89 |
| Total | 11 | 57,89 | 8 | 42,11 | 19 | 100,00 |

Teste de Fisher - P=0,658

Tabela 3. Distribuição da análise sorológica dos animais pertencentes ao Parque Zoobotânico Dr. Adhemar Monteiro – Gavião Real, Capitão Poço e ao 2º Batalhão de Infantaria de Selva (BIS), pela técnica Aglutinação Direta Modificada (MAT), Belém, PA, 2008.

| Gêneros | Soropositivo | | Soronegativo | | Total | |
|------------------|--------------|-------|--------------|-------|-------|--------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>Leopardus</i> | 6 | 31,58 | 2 | 10,53 | 8 | 42,11 |
| <i>Panthera</i> | 7 | 36,84 | 4 | 21,05 | 11 | 57,89 |
| Total | 13 | 68,42 | 6 | 31,58 | 19 | 100,00 |

Teste de Fisher - P=1,000

Tabela 4. Resultado de soropositividade dos animais pertencentes ao Parque Zoobotânico Dr. Adhemar Monteiro – Gavião Real, Capitão Poço e ao 2º Batalhão de Infantaria de Selva (BIS), pelas técnicas de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Aglutinação Direta Modificada (MAT), Belém, PA, 2008.

| Gênero | Nº de examinados | Soropositivos | | | |
|--------------------|------------------|---------------|-------|-----|-------|
| | | HAI | % | MAT | % |
| <i>Leopardus</i> | 8 | 4 | 50 | 6 | 75 |
| <i>Herpailurus</i> | 2 | 1 | 50 | 1 | 50 |
| <i>Panthera</i> | 11 | 7 | 63,64 | 7 | 63,64 |
| Total | 21 | 12 | 57,14 | 14 | 66,67 |

Teste de Fisher: HAI x Gêneros, P = 0,32 / MAT x Gêneros, P = 1,00.

Obteve-se 19,5% (4/21) de amostras soropositivas somente na técnica HAI e 28,6% (6/21), na técnica MAT. As amostras positivas em ambos os testes, simultaneamente, foram 38,1% (8/21) e as negativas, 14,3% (3/21). Das 21 amostras analisadas, apenas 11 (52,4%) apresentaram resultados coincidentes (Tabela 5). O coeficiente Kappa calculado para os dois testes foi de 0,00 e o valor P do teste de McNemar foi de 0,20, indicando ausência de concordância entre os dois testes, isto é, muitos animais foram positivos para um teste e negativos para outro, não estando estatisticamente associados às positivities para os dois testes.

Tabela 5. Tabulação cruzada entre os dois testes (Hemaglutinação indireta – HAI e Aglutinação direta modificada – MAT).

| | HAI+ | HAI- | Total |
|-------|------|------|-------|
| MAT+ | 8 | 6 | 14 |
| MAT- | 4 | 3 | 7 |
| Total | 12 | 9 | 21 |

+: positivo; -: negativo

Kappa = 0,00 / McNemar P = 0,20

Um dos animais pesquisados – animal 5 (*L. wiedii*) – foi o que apresentou maior titulação (1024, na MAT). Nenhum animal que apresentou anticorpos para *T. gondii* manifestou sinal clínico da doença. O animal que apresentou alta titulação estava em bom estado de saúde, a não ser por leve desidratação e escore corporal abaixo do esperado.

No exame coproparasitológico, não foi encontrado oocisto em nenhuma das 18 amostras analisadas.

DISCUSSÃO

Com relação aos valores obtidos pela técnica HAI, obteve-se soropositividade de 57,2% (12/21), inferior à encontrada por Ferraroni e Marzochi (14), que encontraram 75% de soropositividade em quatro animais testados, o qual, por ser um pequeno número de amostras pode influenciar as diferenças observadas. Entretanto, foi observada soropositividade superior à descrita por Costa (15), que obteve 42,9% de soropositividade em sete animais pela HAI, sendo que destes, nenhum animal era soropositivo pela RIFI.

Quando comparamos os resultados da MAT observou-se que os 66,7% encontrados estão muito próximo dos 63% encontrados por Silva et al. (7), na região norte do país.

As amostras dos gatos-mouriscos apresentaram, em ambos os testes, soropositividade de 50% (1/2), compatíveis com as relatadas por Silva et al. (7), que pesquisaram 99 animais dessa espécie pela MAT e, encontraram 45,4% soropositividade.

O gênero *Leopardus*, englobando duas espécies – gato-maracajá (*L. wiedii*) e jaguatirica (*L. pardalis*) – demonstrou amostras com soropositividade semelhante, pela HAI (50%), à encontrada por Costa (15), que observou 50% de soropositividade em jaguatiricas; e, soropositividade muito superior, pela MAT (75%), em relação à encontrada por Silva et al. (7), que encontraram 55,5% de soropositividade em gatos-maracajá e 57,7%, em jaguatiricas.

O gênero *Panthera* com 63,6% (7/11) de amostras soropositivas, em ambos os testes, valor equivalente aos encontrados por Silva et al. (7), com 63,2% (134/212), pela MAT na mesma espécie de felídeo. Costa (15), que encontrou 50% (1/2), pela HAI e Thiangtum et al. (16), que encontraram 33,3% (1/3), pela técnica de aglutinação em látex (LAT), apresentaram valor inferior ao desse estudo.

Os resultados de soropositividade obtidos na HAI e na MAT não foram estatisticamente associados. Patton et al. (17) testaram as duas técnicas em cabras e não encontraram diferença estatística entre os resultados, mesmo obtendo um aumento de 10% dos resultados da HAI para MAT. O presente trabalho demonstra que ambas as técnicas podem revelar resultados discrepantes quando comparadas entre si, porém, a MAT foi capaz de detectar um maior número de animais positivos (15 positivos para MAT e 11 para HAI).

O único gato-maracajá (*L. wiedii*) presente nesta pesquisa foi o animal que apresentou titulação mais elevada (1024, na MAT); os outros animais apresentaram títulos muito menores (16 e 64). Silva et al. (7), utilizando o mesmo teste, encontraram titulação de no máximo 50 para essa espécie. Segundo Silva (9), esta é uma das espécies de felídeos selvagens que não têm o seu papel no ciclo do *T. gondii* bem esclarecido, sendo necessários mais estudos.

Fatores como alimentação a base de carne crua e de outros animais, como pequenos roedores, possibilitam uma titulação mais elevada e uma, provável, infecção aguda, podendo ser esse o caso do gato-maracajá pesquisado.

Como não foi realizada sorologia pareada para analisar a variação dos títulos de IgG, não é possível afirmar se o animal estava em fase pós aguda ou se são títulos altos persistentes.

Os outros animais apresentaram titulação entre 10 e 40 na HAI e 16 a 64, na MAT, demonstrando que tiveram contato com o *T. gondii* em algum momento da vida.

Não foi encontrado oocistos em nenhum dos animais examinados, apesar de Jewell et al. (18) relatarem o encontro de oocistos de *T. gondii* nas fezes de um gato-mourisco e de duas jaguatiricas. Silva (9) afirmou que, com relação à onça-pintada ou preta, ainda não foi registrada a eliminação de oocistos sob condições naturais ou experimentais.

Os resultados encontrados demonstram a infecção toxoplásmica nos animais estudados. Os fatores de risco associados à infecção citados por Silva et al. (19), como a ingestão de carne crua fresca e o consumo de animais mortos por causas desconhecidas, estão presentes nos animais estudados.

A alimentação pode estar relacionada com a alta soropositividade, já que uma das vias de transmissão do *T. gondii* é pelo consumo de carne contaminada com cistos teciduais, segundo Martins (6). O mesmo autor afirmou que entre os animais de consumo, os suínos, ovinos, caprinos e leporinos são mais comumente infectados que bovinos e eqüinos, comparativamente. Os animais estudados recebem, esporadicamente, coelhos vivos como alimentação.

No entanto, não se pode deixar de considerar a possibilidade de contaminação por meio de oocistos no ambiente, já que não há como determinar quando os animais atualmente portadores de infecção crônica da doença se contaminaram pela primeira vez e, por consequência, se há a presença de oocistos viáveis nos criatórios. Em ambos, há condições propícias para a sobrevivência de oocistos, pois ao redor dos recintos há terra ou grama, além de ambas serem áreas sombreadas.

É comum a presença de pequenos insetos nos criatórios, fato este que, segundo Muñoz et al. (20) é de grande importância na disseminação mecânica do *T. gondii*, principalmente nos animais silvestres, que se infectam pela ingestão de insetos, que atuam como hospedeiros de transporte de oocistos fecais presentes no ambiente.

CONCLUSÃO

Nesse estudo, foi encontrada uma relevante prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nos felídeos estudados, apesar dos animais não apresentarem manifestação clínica da doença. Não foi encontrada diferença entre os gêneros com relação à infecção toxoplásmica, porém, foram obtidos resultados discrepantes entre as duas técnicas sorológicas, podendo-se concluir que o método utilizado para a pesquisa pode interferir na detecção de anticorpos para *T. gondii*. As amostras de fezes dos animais estudados não apresentaram oocistos de *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

1. Gonçalves Neto E, Munhoz AD, Albuquerque GR, Lopes CWG, Ferreira AMR. Ocorrência de gatos soropositivos para *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) na cidade de Niterói, Rio de Janeiro. Rev Bras Parasitol Vet. 2003;12(4):145-9.

2. Taboada J, Merchant SR. Infecções por protozoários e por outras causas. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 1a ed. São Paulo: Manole; 1997. p.1495.
3. Jacobs L. Toxoplasmosis: epidemiology and medical importance. *J Wildl Dis.* 1970;6(4):305-12.
4. Vidotto O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. In: Anais do Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 1991; São Paulo. São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 1991. p.80-94.
5. Dubey JP. Zoonosis: toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;205(11):1593-8.
6. Martins CS. Zoonoses felinas: mitos e verdades. In: Souza HJM. Coletâneas em medicina e cirurgia felina. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária; 2003. p.447.
7. Silva JCR, Ogassawara S, Adania CH, Ferreira F, Gennari SM, Dubey JP, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;102(3):217-24.
8. Uchôa CMA, Duarte R, Laurentino-Silva V, Alexandre GMC, Ferreira HG, Amendoeira MRR. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(6):661-9.
9. Silva JCR. Toxoplasmose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 1a ed. São Paulo: ROCA; 2007. p.768-784.
10. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol.* 1980;11(6):562-8.
11. Willis HH. A simple levitation method for detection of hookworm ova. *Med J Aust.* 1921;8:375-6.
12. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis. *Puerto Rico J Publ Health Trop Med.* 1934;9:283-9.
13. Fonseca JS, Martins GA. Curso de estatística. 6a ed. São Paulo: Atlas; 1996.
14. Ferraroni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1980;75(1-2):99-109.
15. Costa AM. Toxoplasmose animal e humana no Parque Zoológico do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2000.
16. Thiangtum K, Nimsuphun B, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Tunwattana W, Tongthainan D, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive felids in Thailand. *Vet Parasitol.* 2006;136(3-4):351-5.

17. Patton S, Johnson SS, Puckett K. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect hemagglutination. *J Parasitol.* 1990;76(1):74-7.
18. Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical Felidae. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21(5):512-7.
19. Silva JCR, Marvulo MF, Dias RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH, et al. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Prev Vet Med.* 2007;78(3-4):286-95.
20. Muñoz DED, Chávez AV, Casas EA, Suárez FA, Gavidia CC, Muñoz KD, et al. Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en monos *Cebus apella* criados en cautiverio. *Rev Investig Vet Perú.* 2005;16(2):163-8.

Recebido em: 16/07/2015

Aceito em: 11/07/2016

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: ANÁLISE DA CASUÍSTICA 2008-2014 NO HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU

Haline Ballestero Fêo¹
Luis Mauricio Montoya Floréz¹
Noeme Sousa Rocha²

RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é um tumor de células redondas de origem incerta, cuja disseminação ocorre principalmente por contato sexual ou por transplante direto de célula neoplásica. Com o objetivo de estabelecerem-se parâmetros segundo a predisposição sexual, racial, etária e principalmente quanto à localização extragenital de maior incidência desse tumor em cães, foi realizado um estudo retrospectivo de 260 casos de ocorrência natural de TVT no período de 6 anos. Os cães mais acometidos foram os machos, sem raça definida (SRD) e com idade acima de 7 anos. A região de acometimento mais frequente é a genitália, seguida pela região nasal, fato esse que leva o TVT a um novo patamar na lista de diagnósticos diferenciais quando consideramos os sinais clínicos de epistaxe uni e/ou bilateral, dispneia compensatória, secreção mucopurulenta a serosanguinolenta e obstrução nasal.

Palavras-chave: tumor venéreo transmissível, cão, extragenital, nasal, epistaxe.

CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR: CASUISTIC ANALYSIS OF 2008-2014 AT THE VETERINARY HOSPITAL OF BOTUCATU

ABSTRACT

The Transmissible Venereal Tumor (TVT) is a round cell tumor with uncertain origin, which is spread by sexual contact or by direct transplantation of neoplastic cells. In order to establish parameters according to sexual, racial, age predisposition and mainly to the extragenital location with the highest incidence of this tumor in dogs, a retrospective study of 260 cases of naturally occurring TVT was performed during the period of 6 years. The most affected dogs were male, with mixed breed and over the age of 7 years. The most frequent involvement region is the genitalia, followed by the nasal region, a fact that leads the TVT to a new level in differential diagnosis considering the clinical signs of uni and/or bilateral epistaxis, compensatory dyspnea, sanguinopurulent or mucopurulent discharge and nasal obstruction.

Keywords: transmissible venereal tumor, dog, extragenital, nasal, epistaxis.

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: ANÁLISIS DE CASOS DE 2008-2014 EN EL HOSPITAL VETERINARIO DE BOTUCATU

RESUMEN

El Tumor Venéreo Transmisibile (TVT) es un tumor de células redondas de origen incierta, su diseminación ocurre principalmente por el contacto sexual o por el trasplante directo de células neoplásicas. Con el objetivo de establecer parámetros según la predisposición sexual,

¹ Departamento de Clínica Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Correspondência.

² Professora do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

racial, etaria y la localización extragenital de mayor incidencia de ese tumor en perros atendidos en el Hospital Veterinario de Botucatu, fue realizado un estudio retrospectivo con 260 casos de ocurrencia natural de TVT durante el periodo de 6 años. Los machos, sin raza definida (SRD) y con edad superior a 7 años fueron los más afectados. La región más afectada fue la genital, seguida por la región nasal, este último aspecto, lleva al TVT a un nuevo nivel en la lista de diagnósticos diferenciales cuando consideramos los signos clínicos de epistaxis uni y/o bilaterar, dispnea compensatoria, secreción mucopurulenta a serosanguinolenta y obstrucción nasal.

Palabras clave: tumor venéreo transmissible, perro, extragenital, nasal, epistaxis.

INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa e sexualmente transmissível, que em condições naturais afeta somente caninos (*Canis familiaris*) (1). O TVT foi reportado pela primeira vez por Hüzzard em 1820 e descrito em 1828 por Delabere-Blaine. No entanto, apenas no século XX, após um relato feito por Sticker, é que o tumor tornou-se consagrado, sendo, então, por muitos anos, designado de Tumor de Sticker.

Sticker constatou que essa neoplasia é transmissível por células transplantáveis, com localização predominantemente venérea, afetando o pênis e a vagina de cães, mas também podendo ser encontrado em regiões extragenitais (2), como o plano nasal (3,4,5). Isso se deve principalmente ao fato de os hábitos sociais dos cães incluírem, dentre outros, o farejamento e as lambeduras, além do contato direto em locais onde houve abrasão cutânea (6,7,8).

O TVT também já foi chamado de sarcoma infeccioso, linfossarcoma infeccioso, granuloma venéreo e condiloma canino, o que reflete a incerteza quanto à sua origem histológica (9). Atualmente o tumor se inclui no grupo dos “Tumores de Células Redondas”, juntamente com os mastocitomas, carcinomas de células basais, linfomas e histiocitomas (10), caracterizando-se como linfocitoide ou plasmocitoide, de acordo com o tipo celular presente, podendo ser ainda classificado como misto, quando há presença dos dois tipos celulares (11).

A diferença significativa de danos no DNA entre os tipos celulares do TVT aponta para a existência de linhagens celulares distintas, na qual o tipo plasmocitóide está associado com maior quantidade de quebras de DNA. Em vista disso, acredita-se que este tipo é mais agressivo, ou seja, com um maior grau de malignidade, quando se compara com os de morfologias linfocitoide ou mista (12).

A doença é frequentemente diagnosticada em cães, e acomete sobretudo os sexualmente ativos (13) e sem raça definida (14). Esse fato reflete uma população de cães mestiços (15) e com fácil acesso às ruas (16), o que permite promiscuidade entre os mesmos (1,8,15). Normalmente o tumor se apresenta como pequenas áreas elevadas, com aspecto de couve-flor ou nodular, cor de carne, friável, com presença de secreção serosanguinolenta e possível infecção bacteriana secundária (6,17).

A presença do TVT foi assinalada em todos os continentes, com maior prevalência nas zonas de clima tropical e subtropical e em grandes cidades (1,5,15,18), com maior incidência na primavera e no verão, correspondendo a 57,9% dos casos relatados durante o ano (19).

O diagnóstico é feito mais comumente pelo exame físico onde se observa o tumor na genitália externa. Nos casos onde o tumor genital não é observado e há suspeita em outras regiões do corpo, a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e/ou a impressão sobre lâmina de microscopia (“imprint”) são necessários, podendo também ser diagnosticado por exame histopatológico (15,20).

O tumor responde a diversas formas de tratamento, como a radioterapia, cirurgia ou criocirurgia, sendo que a quimioterapia é aceita como a mais efetiva para o TVT (12,21). O tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina é muito eficaz e o de eleição,

apresentando prognóstico favorável (22), exceto para os que apresentam metástases (6) ou resistência a quimioterapia (23).

No Brasil, a frequência do TVT é bastante elevada, entretanto existem poucos trabalhos mostrando estatisticamente sua incidência (18). Assim, o objetivo é realizar uma análise retrospectiva de cães com ocorrência natural do TVT, observando-se a raça, idade, sexo e local de maior incidência, contribuindo com o encontro de informações para o controle dessa neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo retrospectivo dos casos de tumor venéreo transmissível (TVT) canino, registrados no Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (HV-FMVZ-UNESP), campus de Botucatu, durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2014.

Foram analisados dados referentes à raça, idade, sexo e localização da massa tumoral. No que se refere à região corpórea acometida, considerou-se o acometimento de múltiplas regiões quando foram encontrados registros de lesões, comprovadamente relacionada ao TVT. Com relação ao método de diagnóstico, foi considerada a citologia aspirativa com agulha fina (CAAF).

As análises foram realizadas mediante estatística de tipo descritiva utilizando o programa Microsoft® Excel® 2007 para Windows.

RESULTADOS

No total foram registrados 260 casos. Neste grupo de animais, o exame clínico proporcionou inicialmente a suspeita do TVT. Os principais sinais clínicos observados foram descargas serosanguinolentas oriundas da vulva, pênis, cavidade nasal (figura 1), além da presença de massa em prepúcio ou vulva e nodulações em pele, cavidade oral e córnea. Ao exame físico, a grande maioria das massas na genitália era friável e ulcerada, podendo ser observado ou não presença de áreas necrosadas.

A presença do tumor foi registrada em 24 raças distintas, das quais os animais sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos (77,3 %), seguidos pelo Poodle (3,8%), Daschound e Pit bull (2,6%), Boxer (2,3%), Labrador (1,9%), Cocker Americano (1,5%), Pastor Alemão, Dálmata e Fox Paulistinha (0,76%), e em proporções de 0,3% outras raças (figura 2).

A idade predominante dos animais foi acima de 7 anos, sendo que um animal tinha 26 anos. Porém, do total de animais, 52 deles não tiveram sua idade computada, pois o proprietário não soube informar (figura 3). Todos tinham acesso à rua ou nela viviam.



Figura 1. Apresentação do TVT nasal com deformidade de face (*), secreção nasal purulenta e epistaxe (→).

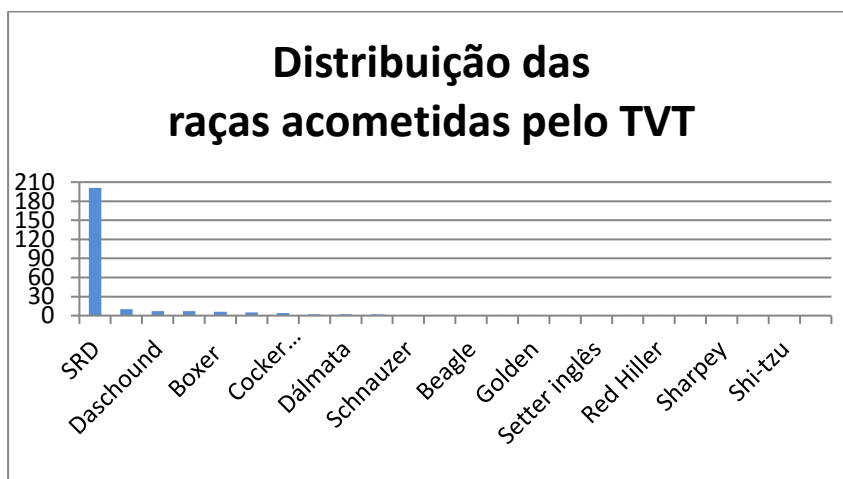


Figura 2. Distribuição das raças acometidas pelo TVT.

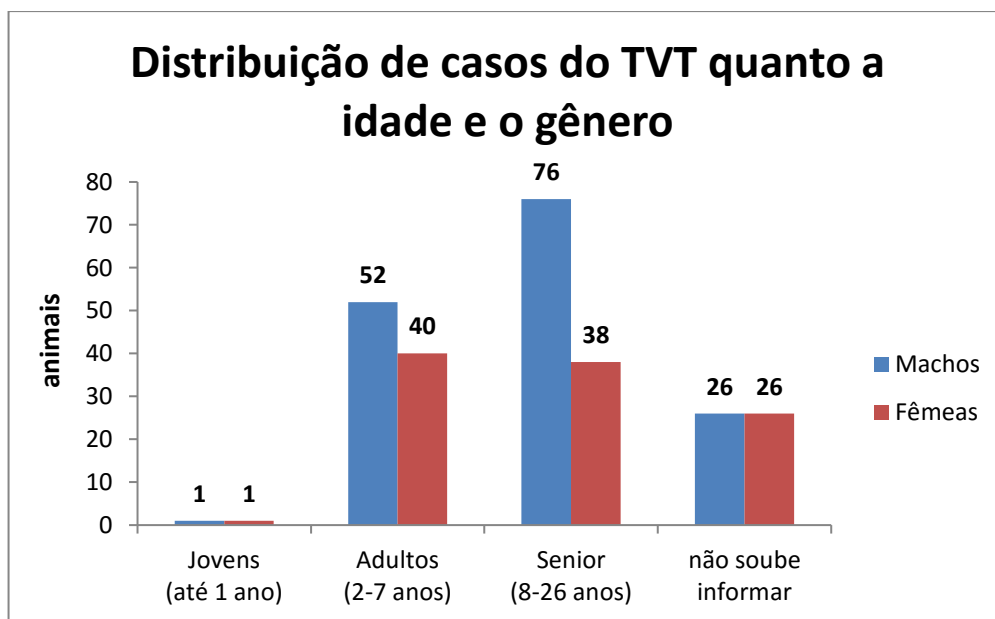


Figura 3. Distribuição de casos do TVT quanto à idade e o gênero.

Nesse estudo constatou-se uma maior incidência do TVT em machos com um total de 155 (59,6%) animais em relação a fêmeas, com 105 (40,4%) animais. A genitália externa foi o local de maior prevalência do tumor (179 casos), seguido pela apresentação nasal (32), cutânea (29), cavidade oral (14), linfonodos (9), face (7), mama em cadelas (5), ânus (4) e córnea (1) (figura 4), sendo o tipo celular mais frequente o plasmocitoide (64,3%), quando comparado com o linfocitoide (2,8%) ou misto (0,3%). Os casos que não tiveram seu subtipo descrito totalizaram 32,5%.

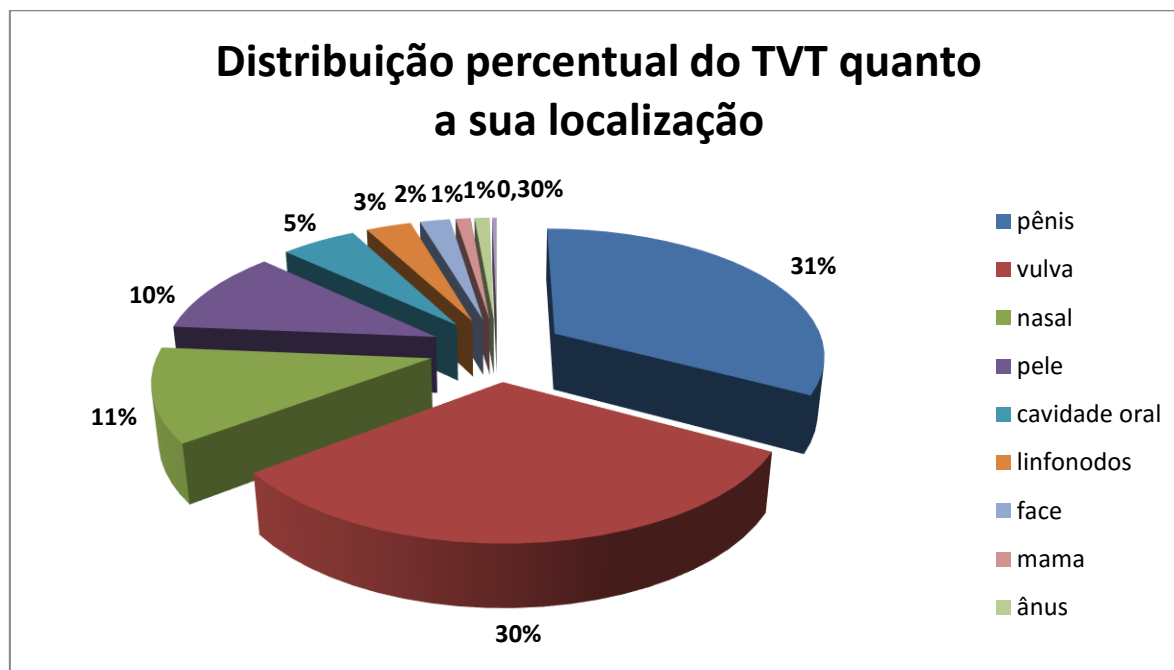


Figura 4. Distribuição percentual do TVT quanto a sua localização.

DISCUSSÃO

A ocorrência do TVT principalmente em cães não domiciliados é bastante frequente em nosso meio (18), apresentando normalmente seu desenvolvimento na mucosa da genitália externa (15,24), embora metástase em outros locais como região nasal e oral, região ocular e cutânea também podem ser acometidas (25).

Gonzalez et al. (26), assim como Sousa et al. (27) e Silva et al. (15) relatam maior envolvimento genital quando comparado com o cutâneo. Brandão et al. (18), em estudos realizados com animais da região de Botucatu observaram resultados semelhantes, além de nódulos em cavidade oral, globo ocular e terceira pálpebra. No presente estudo, além da grande incidência na genitália, a apresentação nasal foi a segunda região de maior frequência do tumor, fato esse que leva o TVT a um novo patamar na lista de diagnósticos diferenciais em casos de epistaxe uni e/ou bilateral, dispneia compensatória, secreção mucopurulenta a serosanguinolenta e obstrução nasal.

O tropismo extragenital é atribuído ao TVT quando localizado em qualquer região do corpo do animal, sem que a genitália esteja envolvida (28). Da mesma forma que Amaral et al. (29), na maioria dos casos de localização extragenital, a genitália também estava comprometida e/ou havia história de TVT anterior, atribuindo o fato ao processo de invasão e metástase. Além disso, devemos considerar que os animais possuem hábitos sociais diversos, como farejar e lambe, o que promove uma maior predisposição do TVT em áreas extragenitais. Quando a localização é em cavidade nasal, cavidade oral ou região ocular, os

sinais clínicos caracterizam-se por espirros, dispneia, epistaxe, halitose intensa, queda de dentes, epífora e deformação oral ou facial (5).

Dentre os diagnósticos diferenciais, podemos considerar a *Erlichia canis* (30-32) como potente causa para epistaxe, além de Leishmaniose (33-35), tumores intranasais (36), infecções fúngicas (37,38), intoxicação por rodenticidas anticoagulantes (36) e presença de corpos estranhos na cavidade nasal. Segundo Mylonakis et al. (36) a Leishmaniose ocorrendo isoladamente ou em combinação com a Erliquiose monocítica canina foram as principais causas de epistaxe canina, sendo que os animais podem apresentar epistaxe apenas ou em combinação com outros sinais clínicos.

A patogênese da epistaxe induzidas pela Leishmaniose canina não está completamente esclarecida, no entanto, tem-se sugerido que ocorre devido a um mecanismo multifatorial, combinando uma função plaquetária prejudicada, aumento de viscosidade do soro, atribuída a hiperglobulinemia (34), e ulceração nasal da mucosa, além de uma possível rinite crônica (33). No caso da Erliquiose monocítica canina a epistaxe ocorre em grande parte como consequência da trombocitopenia e/ou trombocitopatia (39,36).

Segundo Rocha et al. (3) o diagnóstico citológico do TVT nasal é fundamental para pacientes que requerem tratamento imediato, principalmente quando apresentam dispneia. Sem a identificação exata do tipo de neoplasia, corre-se o risco de instituir tratamentos citostáticos para uma lesão granulomatosa não neoplásica, e assim desnecessariamente expor o paciente à toxicidade dos fármacos antitumorais (27).

Embora Rocha et al. (3) não tenham observado causas relevantes de imunossupressão ou doenças associadas, a ocorrência do TVT nasal associado à leishmaniose cutânea em um cão já foi relatado, acreditando-se que o fato ocorreu principalmente devido a imunossupressão causada pelo protozoário (40,41). Em diversos estudos tem sido discutida a relação entre o TVT e o sistema imune do hospedeiro, questionando inclusive possibilidades de progressões e/ou regressões do tumor (42-47). De fato, a transferência tumoral só é possível entre animais que compartilham o mesmo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) ou quando há comprometimento da imunidade (48), permitindo, dessa forma, a transposição da barreira tecidual por meio do contato entre regiões lesionadas (45-49).

Quando comparamos os resultados com Amaral et al. (29), realizados na mesma instituição em 2004, há diferença quanto a região extragenital mais frequente e a idade, se assemelhando, porém, quanto ao sexo e o tipo celular predominante. Amaral et al. (29) verificaram que a região cutânea se apresentou mais frequente que a nasal, fato esse que se mostra contrário aos achados desse estudo. A idade mais acometida segundo a autora foi a fase adulta, em torno de 4 anos, enquanto neste caso foi observado o tumor mais frequente em animais sênior, acima de 8 anos. Isso provavelmente se deve ao fato de os animais possuírem uma taxa de sobrevivência cada vez maior, adicionado ao fato de o TVT não ser um tumor com características que provocam o óbito, de forma que Amaral et al. (29) já chamou a atenção a respeito do aumento da ocorrência do TVT em animais sêniores.

Quanto a predisposição sexual, Amaral et al. (29) observaram maior prevalência em machos, com uma maior apresentação do tipo plasmocitoide, condizendo com estes resultados. A grande ocorrência do TVT em machos, na região genital, provavelmente está relacionada com as características de coito dos cães, que permite contato prolongado e formação de escoriações na mucosa genital, tornando a cópula um eficiente modo de transmissão (9), de forma que um macho pode copular com várias fêmeas, aumentando assim a probabilidade de transmissão.

A maioria dos estudos sobre TVT de ocorrência natural não mostra ainda predisposição racial (7,14,15,25,28,50), fato esse que também corrobora com nossos estudos, o qual apresentou uma porcentagem muito superior de animais SRD em relação as demais raças. Segundo Silva et al. (15), o maior acometimento do TVT em animais mestiços pode estar

relacionado a famílias de baixas condições sócioeconômicas que não podem adquirir animais com raças definidas de alto valor econômico, e que por sua vez, permite o acesso de seus animais às ruas.

Assim, embora o TVT nasal não seja tão comumente visto na prática como o TVT na região de genitália, esse estudo mostrou que, na forma extragenital, ele é o mais frequente. O tumor se manifesta geralmente por epistaxe e pode ser localmente invasivo, necessitando de um diagnóstico diferencial em relação à Erliquiose e a Leishmaniose, em áreas onde essas enfermidades são endêmicas, sendo que o exame citológico constitui um método diagnóstico barato, rápido e de fácil execução.

REFERÊNCIAS

1. Rogers KS. Transmissible venereal tumor. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1997;19(9):1036-45.
2. Chiti L, Amber EI. Incidence of tumors seen at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zâmbia: a four year retrospective study. *Zimbabwe Vet J.* 1992;3(4):143-7.
3. Rocha TMM, Terres MF, Sotello A, Kozemjakin D, Malucelli L, Maia R. Tumor venéreo transmissível nasal em um cão. *Rev Acad Cienc Agrar Ambient.* 2008;6(3):349-53.
4. Papazoglou LG, Koutinas AF, Plevraki AG, Tontis D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001;48(7):391-400.
5. Pereira CS, Muzzi RAL, Porsani MYH, Campos IO, Nogueira RB. Tumor venéreo transmissível nasal, um diagnóstico diferencial das doenças do trato respiratório superior em cães: relato de caso. In: *Anais do XXII Congresso de pós-graduação da UFLA; 2013; Lavras.* Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2013.
6. MacEwen EG. Transmissible venereal tumor. In: *Withrow SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology.* Philadelphia: WB Saunders; 2001. p.651-6.
7. Park MS, Kim Y, Kang MS, Oh SY, Cho DY, Shin NS, et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18(1):130-3.
8. Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet Res.* 2014;10:168.
9. Cohen D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res.* 1985;43:75-112.
10. Vermooten MI. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. *J S Afr Vet Assoc.* 1987;58(3):147-50.
11. Amaral AS, Bassani-Silva S, Ferreira I, Fonseca LS, Andrade FHE, Gaspar LFJ, et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Rev Port Cienc Vet.* 2007;102(563-564):253-60.

12. Dabus DMM, Tentrin TC, Bocardo M, Lima GS, Lot RFE, Bariani MH, et al. Estudo epidemiológico do tumor venéreo transmissível baseado nos padrões plasmocitóide e linfocitóide em cães atendidos no hospital veterinário da faculdade de medicina veterinária e zootecnia de garça. *Rev Cientif Eletron Med Vet.* 2008;6(11):1-7.
13. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun.* 2000; 24(8):545-56.
14. Flores PE, Diez YX, Diaz RAM, Urcelay VS, Cattaneo UG. Comparison of the neoplasms recorded in two periods (1981-1985 and 1986- 1988) at the surgery section of the Faculty of Veterinary Medicine. *Av Cienc Vet.* 1993;8:61-5.
15. Silva MCV, Barbosa RR, Santos RC, Chagas RSN, Costa WP. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA. *Acta Vet Brasilica.* 2007; 1(1):28-32.
16. Sobral RA, Tinucci-Costa M, Camacho A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. *Ars Vet.* 1998; 14(1):1-10.
17. Johnson CA. Infecções genitais e tumor venéreo transmissível. In: Nelson RW, Couto CG. *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p.522-5.
18. Brandão CVS, Borges AG, Ranzani JJT, Rahal SC, Teixeira CR, Rocha NS. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 2002;5(1):25-31.
19. Gandotra VK, Chauhan FS, Sharma RD. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. *Indian Vet J.* 1993;70(5):854-7.
20. Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods.* Philadelphia: WB Saunders; 1989.
21. Özalp GR, Zik B, Bastan A, Peker S, Özdemir-Salci ES, Bastan I, et al. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). *Biotech Histochem.* 2012;87(5):325-30.
22. Freitas NMS. Tumor venéreo transmissível em cães atendidos nos anos de 2007 e 2008 no hospital veterinário da universidade federal rural da Amazônia [monografia]. Belém: Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA; 2009.
23. Gaspar LFJ, Ferreira I, Colodel MM, Seullner Brandão CV, Rocha NS. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turk J Vet Anim Sci.* 2010;34(5):447-54.
24. Araujo MR. Estudo retrospectivo e prospectivo de tumores cutâneos em cães e diferenciação de tumores cutâneos de células redondas pela imunohistoquímica [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG; 2011.

25. Cruz GD, Santos CF, Santos CR, Ruschi CS, Elias T, Xavier JG, et al. Metástase visceral de tumor venéreo transmissível em cão. *Vet Zootec.* 2009;16(3):465-70.
26. Gonzalez CG, Sanchez BCA, Velez HME, Buen DE, An DE, Buen DE. Neoplasms of the reproductive system in bitches: retrospective study over 6 years. *Vet Mex.* 1997; 28(1):31-4.
27. Sousa J, Saito V, Nardi AB, Rodaski S, Guérios SD, Bacila M. A survey on the incidence and the therapeutic procedures of the canine transmissible venereal tumor, the sticker's lymphosarcoma. *Arch Vet Sci.* 2000;5:41-8.
28. Nielsen SW, Kennedy PC. Tumors of the genital systems. In: Moulton JE. *Tumors in domestic animals.* 3a ed. Los Angeles: University of California Press; 1990. p.479-517.
29. Amaral AS, Gaspar LFJ, Bassani-Silva S, Rocha NS. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). *Rev Port Cienc Vet.* 2004;99(551):167-71.
30. Moreira SM, Bastos CV, Araújo RB, Santos M, Passos LMF. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2003;55(2):141-7.
31. Vieira RFC, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos AP, Santos RP, Dutra LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(1):1-12.
32. Baba K, Itamoto K, Amimoto A, Kitagawa K, Hiraoka H, Mizuno T, et al. Ehrlichia canis infection in two dogs that emigrated from endemic areas. *J Vet Med Sci.* 2012;74(6):775-8.
33. Jüttner C, Sánchez MR, Landeras ER, Slappendel RJ, Arnold CF. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec.* 2001;149(6):176-9.
34. Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, et al. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):866-72.
35. Cavalcanti A, Lobo R, Cupolillo E, Bustamante F, Porrozzi R. Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: a case report. *Parasitol Int.* 2012;61(4):738-40.
36. Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Lazaridis V, Leontides LS, Kostoulas P, Koutinas AF. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). *J Small Anim Pract.* 2008;49(4):191-6.
37. Benitah N. Canine nasal aspergillosis. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2006;21(2):82-8.
38. Epstein S, Hardy R. Clinical resolution of nasal aspergillosis following therapy with a homeopathic remedy in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011;47(6):e110-5.

39. Neer TM, Breitshwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med.* 2002;16(3):309-15.
40. Santos FGA, Vasconcelos AC, Nunes JES, Cassali GD, Paixão TA, Moro L. O tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). *Biosci J.* 2005;21(3):41-53.
41. Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2006;35(1):115-8.
42. Liao KW, Hung SW, Hsiao YW, Bennett M, Chu RM. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;92(3-4):149-62.
43. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology: a review. *Vet Q.* 2003;25(3):101-11.
44. Hsiao Y, Liao K, Chung T, Liu C, Hsu C, Chu R. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(7):1091-104.
45. Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Lopes RA, Cardoso TC, Luvizotto MCR. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. *Braz J Vet Pathol.* 2011; 4(1):67-75.
46. Chiang HC, Liao AT, Jan TR, Wang YS, Lei HJ, Tsai MH, et al. Gene-expression profiling to identify genes related to spontaneous tumor regression in a canine cancer model. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151(3-4):207-16.
47. Siddle HV, Kaufman J. Immunology of naturally transmissible tumours. *Immunology.* 2014;144(1):11-20.
48. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell.* 2006;126(3):477-87.
49. Liu CC, Wang YS, Lin CY, Chuang TF, Liao KW, Chi KH, et al. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(4):479-91.
50. Cowell RL, Tyler RD. *Diagnostic cytology and hematology of the dogs and cats.* 2nd ed. Saint Louis: Mosby; 1999.

Recebido em: 11/08/2015

Aceito em: 11/07/2016

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS LINFONODOS AXILARES E INGUINAIS SUPERFICIAIS EM CADELAS (*Canis familiaris*) SUBMETIDAS À MASTECTOMIA TERAPÊUTICA

Tábata Maués¹
Maria de Lourdes Gonçalves Ferreira²
Ana Maria Reis Ferreira³
Juliana da Silva Leite³

RESUMO

Os tumores mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas, constituindo cerca de 50% do total de neoplasias da espécie canina. Neoplasias mamárias malignas podem estabelecer metástases para os linfonodos regionais e se disseminarem para outros sítios. A reatividade de linfonodos nas adjacências do tumor é um fator relacionado ao prognóstico da neoplasia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de alterações histopatológicas das lesões mamárias em cadelas, principalmente metástase de neoplasias mamárias malignas, nos linfonodos axilar e inguinal superficial sem alterações macroscópicas. A remoção do linfonodo inguinal foi realizada juntamente com a da glândula inguinal devido à íntima associação dessas duas estruturas. Já para a localização e exérese do linfonodo axilar, preconizou-se a ejeção do corante azul de metileno a 2% ao redor da mama torácica cranial ipsilateral à lesão. A biópsia excisional dos linfonodos sentinela, axilar e inguinal superficial, no mesmo tempo cirúrgico da mastectomia e a posterior análise histopatológica da cadeia mamária e dos linfonodos permitiu o diagnóstico do tipo de neoplasia primária, do grau de reatividade linfoide e da metástase linfática. Dessa forma, foi possível identificar a ocorrência de metástase para 4,55% dos linfonodos axilares e 11,36% dos inguinais ipsilaterais às cadeias com neoplasia mamária maligna e uma tendência maior de reatividade dos inguinais em comparação com os axilares.

Palavras-chave: neoplasia mamária, metástase, reatividade linfoide.

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF AXILLARY AND SUPERFICIAL INGUINAL LYMPH NODES IN BITCHES (*Canis familiaris*) UNDERWENT TO THERAPY MASTECTOMY

ABSTRACT

Mammary tumors are the most common neoplasms in dogs, corresponding to 50% of neoplasms of the canine specie. Malignant breast tumors may metastasize to regional lymph nodes and spread to other sites. The reactivity of lymph nodes in the tumor surroundings is a factor related to the prognosis of cancer. The objective of this study was to evaluate the incidence of histopathological changes in dogs with breast lesions, especially metastasis of

¹ Doutoranda em Clínica e Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Contato principal para correspondência.

² Professora de Patologia e Clínica Cirúrgica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

³ Professora de Anatomia Patológica Veterinária, Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense.

malignant breast tumors in axillary and superficial inguinal lymph nodes without macroscopic changes. The removal of the inguinal lymph node was held together with the inguinal gland due to the intimate association of these two structures. For localization and excision of axillary lymph node was necessary to inject the dye methylene blue 2% around the ipsilateral cranial breast to chest injury. The excisional biopsy of sentinel nodes, axillary and superficial inguinal, during mastectomy and subsequent histopathological analysis of the mammary chain and lymph nodes allowed the diagnosis of the type of primary tumor, the degree of lymphoid reactivity and lymphatic metastasis. Thus, it was possible to identify the occurrence of metastasis to 4.55% of axillary and to 11.36% of inguinal lymph nodes of the chains with malignant breast cancer and a greater tendency of reactivity to inguinal lymph nodes when compared to axillary.

Keywords: breast cancer, metastasis, lymphoid reactivity.

EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS AXILAR Y SUPERFICIE INGUINAL EN PERRAS (*Canis familiaris*) DEBAJO MASTECTOMÍA TERAPÉUTICA

RESUMEN

Los tumores mamarios son las neoplasias más comunes en perros, que constituyen alrededor del 50% de las neoplasias de la especie canina. Los tumores de mama malignos pueden establecer metástasis a los ganglios linfáticos regionales y se extendió a otros sitios. La reactividad de los ganglios linfáticos en los alrededores del tumor es un factor relacionado con el pronóstico del cáncer. El objetivo de este estudio fue evaluar la incidencia de los cambios histopatológicos de lesiones de mama en perros, especialmente la metástasis de los tumores malignos de mama en los ganglios linfáticos axilares e inguinales superficiales sin cambios macroscópicos. La retirada del ganglio linfático inguinal se llevó a cabo junto con la glándula inguinal debido a la íntima asociación de estas dos estructuras. Para la localización y la escisión de la linfa axilar aplicado colorante azul de metileno 2% alrededor de la mama torácica craneal a la lesión. La biopsia excisional de ganglios centinela, axilar y inguinal superficial, durante la mastectomía y posterior análisis histopatológico de los ganglios linfáticos y cadena mamaria permitió el diagnóstico del tipo de tumor primario, el grado de reactividad linfoide y la identificación de metástasis linfática. Así, fue posible identificar la aparición de metástasis a 4,55% de los ganglios linfáticos axilares y a 11,36% de los inguinales de las cadenas con cáncer de mama maligno y la más probable reactividad de los ganglios linfáticos inguinales en comparación con los axilares.

Palabras clave: cáncer de mama, metástasis, reactividad linfoide.

INTRODUÇÃO

Neoplasias mamárias malignas podem estabelecer metástases linfáticas para os linfonodos regionais. A reação de linfonodos nas adjacências do tumor é um fator relacionado

ao prognóstico da neoplasia. A atividade celular no linfonodo pode indicar evidência morfológica de uma resposta imune antitumoral ou de metástase.

O objetivo deste trabalho é avaliar a incidência de alterações histopatológicas, principalmente metástase de neoplasias mamárias malignas, nos linfonodos sentinela (axilar e inguinal superficial) sem alterações macroscópicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados linfonodos sentinela (LS) removidos cirurgicamente de 71 cadelas adultas de raças variadas, incluindo animais sem raça definida (SRD), portadoras de lesões mamárias, submetidas à mastectomia radical no período de março de 2011 a novembro de 2012.

Incluíram-se no trabalho os animais portadores de lesões mamárias diagnosticadas citopatologicamente com ausência de metástases distantes aos exames de imagem (exames radiográfico de tórax e ultrassonográfico abdominal); ausência de alterações nos demais exames pré-operatórios (eletrocardiográfico, hemograma e bioquímica sanguínea) que impossibilitassem o procedimento anestésico-cirúrgico; e com linfonodos axilares e inguinais superficiais sem alterações aparentes ao exame físico. Aqueles com carcinoma inflamatório foram excluídos do estudo em função da indicação terapêutica de não ressecção desta neoplasia.

Foram selecionadas cadelas sem alteração macroscópica de linfonodos axilar e inguinal superficial e nos estágios I, II, III e IV de estadiamento clínico da neoplasia (1), ou seja, pacientes com tumores de tamanhos variados, com ou sem comprometimento de LS e sem evidências de metástases distantes aos exames de imagem.

Realizou-se mastectomia uni ou bilateral. A biópsia excisional dos linfonodos ipsilaterais à(s) mama(s) afetada(s) foi realizada no transoperatório da mastectomia. Para localização do linfonodo axilar, injetou-se corante azul de metileno. Conforme descrito por Campos et al. (2), aplicou-se por via intradérmica, solução de azul de metileno a 2% estéril durante o pré-operatório imediato. Foram administrados 0,5 ml de azul de metileno para cadelas com até 15 kg e 1,0 ml para cadelas com peso superior a 15 kg na área ao redor do(s) teto(s) da(s) mama(s) torácica(s) cranial(is). Já o linfonodo inguinal superficial era removido em bloco juntamente com a mama inguinal e o tecido gorduroso adjacente. Os linfonodos axilares e inguinais superficiais removidos assim como os acessórios foram mensurados com auxílio de paquímetro e avaliados macroscopicamente quanto à regularidade, coloração, textura e aspecto ao corte de forma a selecionar apenas linfonodos sem alterações macroscópicas.

Adotaram-se os critérios estabelecidos por Cassali et al. (3) para a análise histopatológica das cadeias mamárias. O material (cadeia mamária e linfonodos axilar e inguinal superficial) foi acondicionado em solução aquosa de formol tamponado a 10% após a retirada. As peças foram clivadas e reidratadas em soluções aquosas alcoólicas, de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina histológica. Cortes de 5µm de espessura foram efetuados em micrótomo⁴ e corados pelo método de rotina, hematoxilina-eosina (HE). O exame microscópico foi efetuado em

⁴ Micrótomo Spencer, marca América Optical (Southbridge, Massachusetts, EUA).

microscópio de luz⁵. Os linfonodos foram clivados por inteiro com corte transversal, ou seja, os cortes englobaram toda a extensão dos mesmos com intuito de avaliá-los por completo. As informações obtidas a partir da histopatologia e complicações foram avaliadas por meio de análises descritivas.

RESULTADOS

Os linfonodos sentinela foram classificados histopatologicamente como:

- a) Linfonodo sem alteração histopatológica;
- b) Linfonodo pouco reativo (Figura 1);
- c) Linfonodo moderadamente reativo (Figura 2);
- d) Linfonodo acentuadamente reativo (Figura 3);
- e) Linfonodo com metástase (Figura 4).

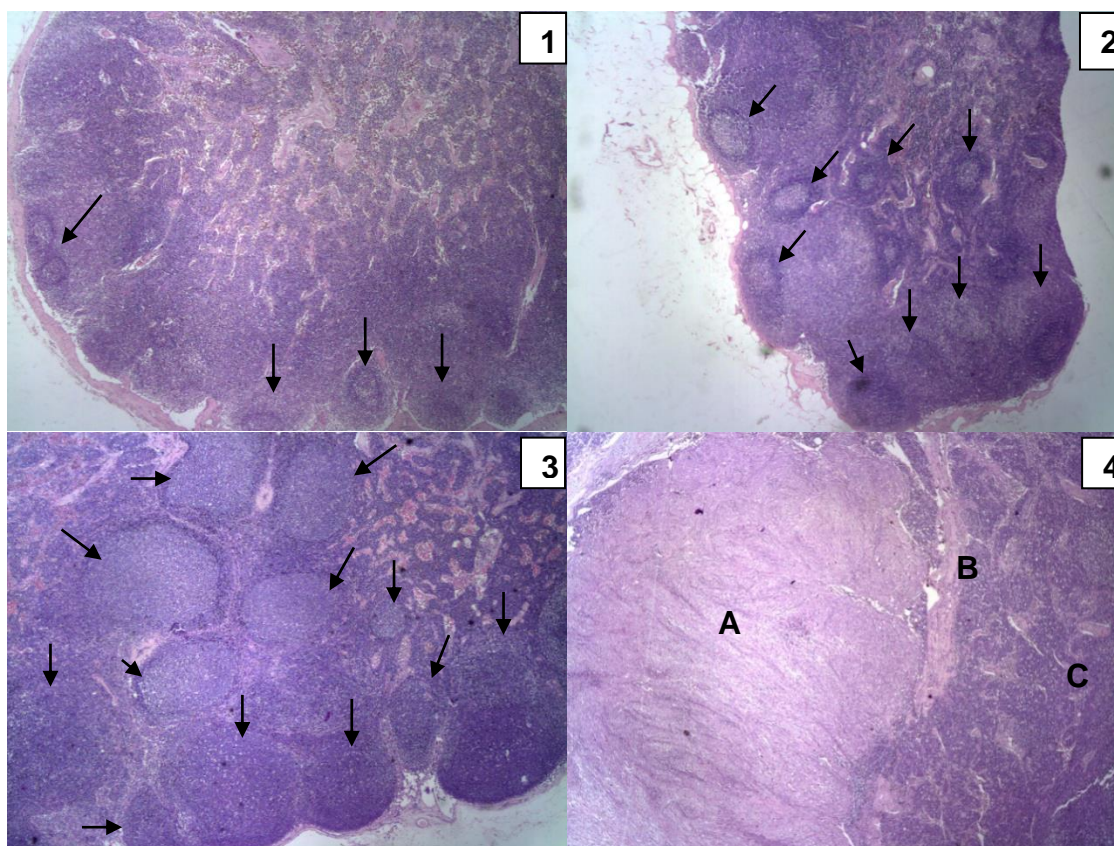


Figura 1. Linfonodo axilar canino. Fotomicrografia de linfonodo axilar com alguns centros germinativos evidentes (setas), sendo classificado histopatologicamente como pouco reativo (HE, obj 4x). Figura 2. Linfonodo inguinal superficial acessório, canino. Fotomicrografia de linfonodo inguinal superficial acessório com quantidade moderada de centros germinativos evidentes (setas), sendo classificado histopatologicamente como moderadamente reativo (HE, obj 4x). Figura 3. Linfonodo inguinal superficial canino. Fotomicrografia de linfonodo inguinal superficial com quantidade acentuada de centros germinativos evidentes (setas), sendo classificado histopatologicamente como fortemente reativo (HE, obj 4x). Figura 4. Linfonodo inguinal superficial canino. Fotomicrografia evidenciando (A) tecido neoplásico metastático, (B) tecido conjuntivo da trabécula do linfonodo inguinal superficial e (C) tecido linfóide (HE, obj 4x).

⁵ Olympus BX41, marca Olympus (Southend-on-Sea, Reino Unido).

Em 11,36% (5/44) dos animais com neoplasia mamária maligna, constatou-se comprometimento metastático em linfonodo sentinela pela coloração de rotina. Desses, nenhum animal apresentou metástases exclusivamente em linfonodo axilar, 60% (3/5) apresentou metástase apenas em linfonodo inguinal superficial e 40% (2/5), em ambos os linfonodos.

Dentre os animais que apresentaram metástase em linfonodo axilar (Figuras 5 e 6) e inguinal concomitantemente, um deles apresentava tumoração (Carcinoma Simples Túbulopapilar) apenas na mama inguinal e o outro apresentava a tumoração primária na mama torácica caudal e outra na inguinal (ambas Carcinoma em Tumor Misto).

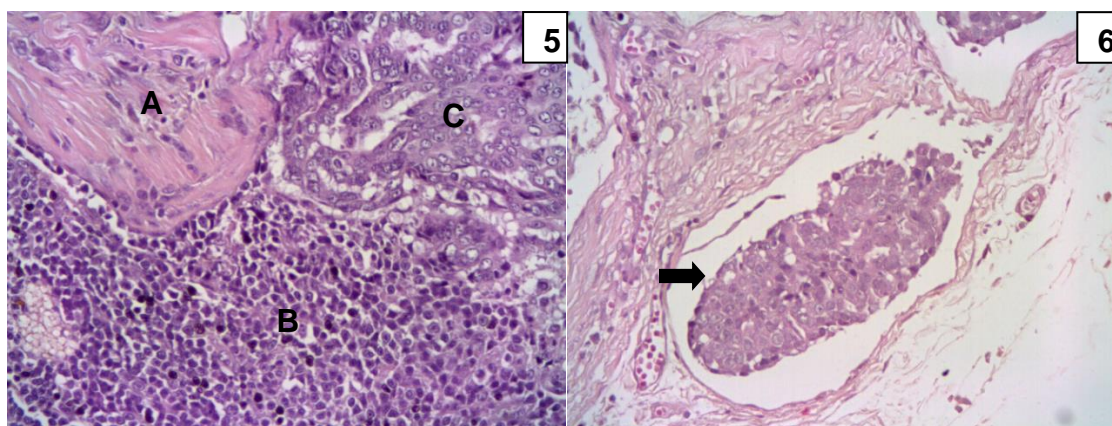


Figura 5. Linfonodo axilar canino. Fotomicroscopia evidenciando (A) tecido conjuntivo da trabécula do linfonodo axilar, (B) tecido linfóide e (C) tecido neoplásico metastático (HE, obj 40x). Figura 6. Linfonodo axilar canino. Fotomicrografia evidenciando (seta) êmbolo composto por conjunto de células metastáticas no interior de um vaso linfático da cápsula do linfonodo axilar (HE, obj 40x).

Já dentre aqueles que apresentaram metástase apenas em linfonodo inguinal, um deles apresentava tumoração (Carcinoma Simples Tubulopapilar) apenas na mama torácica caudal, outro na mama inguinal (Carcinoma em Tumor Misto) e o terceiro em ambas as torácicas e abdominais, sendo a neoplasia primária na abdominal cranial (todas eram Carcinoma em Tumor Misto).

Todos os LS dos 71 animais foram avaliados por exame histopatológico e os resultados estão dispostos nas tabelas 1 a 5, relacionando ao tipo de lesão mamária e à localização do tumor único ou primário, no caso de neoplasias múltiplas na cadeia.

Os resultados de alterações linfoides relacionados ao tipo de lesão mamária encontram-se resumidos na tabela 1; aqueles referentes a alterações linfoides e cadeias acometidas por lesão mamária única, nas tabelas 2 e 3; e aqueles referentes a alterações linfoides e cadeias acometidas por lesões mamárias múltiplas, nas tabelas 4 e 5.

Tabela 1. Frequência absoluta das alterações em linfonodos axilar e inguinal superficial ipsilaterais às diversas lesões mamárias não neoplásicas, neoplásicas benignas e neoplásicas malignas encontradas.

| Lesão mamária | Baixa Reatividade | | Moderada Reatividade | | Elevada Reatividade | | Ausência de alterações | | Metástase | |
|---------------------------------|-------------------|-----|----------------------|-----|---------------------|-----|------------------------|-----|-----------|-----|
| | LA | LIS | LA | LIS | LA | LIS | LA | LIS | LA | LIS |
| Hiperplasia Ductal | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| Hiperplasia Lobular | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma Simples | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma Complexo | 2 | 5 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Tumor misto benigno | 9 | 10 | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Papiloma ductal | 9 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma Complexo | 4 | 5 | 4 | 8 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Carcinoma Simples Tubulopapilar | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 1 | 3 |
| Carcinoma de células fusiformes | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Carcinoma mucinoso | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma em Tumor Misto | 19 | 27 | 5 | 11 | 10 | 3 | 4 | 6 | 1 | 5 |

* LA= Linfonodo axilar; LIS= Linfonodo Inguinal Superficial.

Tabela 2. Relação entre a distribuição de frequência absoluta e relativa das alterações em linfonodos axilares e a localização das lesões mamárias únicas não neoplásicas, neoplásicas benignas e neoplásicas malignas.

| Localização da Lesão Não Neoplásica única | Baixa Reatividade LA | | Moderada Reatividade LA | | Elevada Reatividade LA | | Ausência de alterações LA | | Metástase LA | |
|--|----------------------|--------|-------------------------|-------|------------------------|-------|---------------------------|--------|--------------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 2 | 50,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 50,00 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Benigna única | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 3 | 75,00 | 1 | 25,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 5 | 71,43 | 1 | 14,29 | 0 | 0,00 | 1 | 14,29 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Maligna única | | | | | | | | | | |
| G1 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 2 | 40,00 | 0 | 0,00 | 1 | 20,00 | 2 | 40,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 2 | 66,67 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 33,33 | 0 | 0,00 |
| G5 | 2 | 25,00 | 2 | 25,00 | 0 | 0,00 | 3 | 37,50 | 1 | 12,50 |

* LA= Linfonodo Axilar; N= Frequência Absoluta; %= Frequência Relativa; G1= Glândula Mamária Torácica Cranial; G2= Glândula Mamária Torácica Caudal; G3= Glândula Mamária Abdominal Cranial; G4= Glândula Mamária Abdominal Caudal; G5= Glândula Mamária Inguinal.

Tabela 3. Relação entre a distribuição de frequência absoluta e relativa das alterações em linfonodos inguinais superficiais e a localização das lesões mamárias únicas não neoplásicas, neoplásicas benignas e neoplásicas malignas.

| Localização da Lesão Não Neoplásica única | Baixa Reatividade LIS | | Moderada Reatividade LIS | | Elevada Reatividade LIS | | Ausência de alterações LIS | | Metástase LIS | |
|--|-----------------------|--------|--------------------------|-------|-------------------------|-------|----------------------------|-------|---------------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 1 | 25,00 | 1 | 25,00 | 0 | 0,00 | 2 | 50,00 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Benigna única | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 2 | 40,00 | 1 | 20,00 | 0 | 0,00 | 2 | 40,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 6 | 75,00 | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Maligna única | | | | | | | | | | |
| G1 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 1 | 50,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 50,00 |
| G3 | 4 | 66,67 | 0 | 0,00 | 1 | 16,67 | 1 | 16,67 | 0 | 0,00 |
| G4 | 3 | 60,00 | 1 | 20,00 | 0 | 0,00 | 1 | 20,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 2 | 18,18 | 2 | 18,18 | 1 | 9,09 | 3 | 27,27 | 3 | 27,27 |

* LIS= Linfonodo Inguinal Superficial; N= Frequência Absoluta; %= Frequência Relativa; G1= Glândula Mamária Torácica Cranial; G2= Glândula Mamária Torácica Caudal; G3= Glândula Mamária Abdominal Cranial; G4= Glândula Mamária Abdominal Caudal; G5= Glândula Mamária Inguinal.

Tabela 4. Relação entre a distribuição de frequência absoluta e relativa das alterações em linfonodos axilares primários e acessórios e a localização das lesões neoplásicas benignas e malignas primárias de cadeias mamárias com mais de uma lesão.

| Localização da Lesão Neoplásica Benigna primária | Baixa Reatividade LA | | Moderada Reatividade LA | | Elevada Reatividade LA | | Ausência de alterações LA | | Metástase LA | |
|---|----------------------|-------|-------------------------|-------|------------------------|--------|---------------------------|-------|--------------|--------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 3 | 60,00 | 2 | 40,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 2 | 66,67 | 0 | 0,00 | 1 | 33,33 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 0 | 0,00 | 1 | 25,00 | 1 | 25,00 | 2 | 50,00 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Maligna primária | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 |
| G3 | 4 | 44,44 | 2 | 22,22 | 1 | 11,11 | 2 | 22,22 | 0 | 0,00 |
| G4 | 3 | 33,33 | 1 | 11,11 | 4 | 44,44 | 1 | 11,11 | 0 | 0,00 |
| G5 | 4 | 44,44 | 2 | 22,22 | 3 | 33,33 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |

* LA= Linfonodo Axilar; N= Frequência Absoluta; %= Frequência Relativa; G1= Glândula Mamária Torácica Cranial; G2= Glândula Mamária Torácica Caudal; G3= Glândula Mamária Abdominal Cranial; G4= Glândula Mamária Abdominal Caudal; G5= Glândula Mamária Inguinal.

Tabela 5. Relação entre a distribuição de frequência absoluta e relativa das alterações em linfonodos inguinais superficiais primários e acessórios e a localização das lesões neoplásicas benignas e malignas primárias de cadeias mamárias com mais de uma lesão.

| Localização da Lesão Neoplásica Benigna primária | Baixa Reatividade LIS | | Moderada Reatividade LIS | | Elevada Reatividade LIS | | Ausência de alterações LIS | | Metástase LIS | |
|---|-----------------------|-------|--------------------------|--------|-------------------------|-------|----------------------------|-------|---------------|--------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G3 | 4 | 80,00 | 0 | 0,00 | 1 | 20,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G4 | 3 | 60,00 | 1 | 20,00 | 1 | 20,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 2 | 33,33 | 2 | 33,33 | 1 | 16,67 | 1 | 16,67 | 0 | 0,00 |
| Localização da Lesão Neoplásica Maligna primária | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G2 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 |
| G3 | 3 | 27,27 | 2 | 18,18 | 0 | 0,00 | 4 | 36,36 | 2 | 18,18 |
| G4 | 5 | 38,46 | 8 | 61,54 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| G5 | 5 | 50,00 | 1 | 10,00 | 3 | 30,00 | 1 | 10,00 | 0 | 0,00 |

* LIS= Linfonodo Inguinal Superficial; N= Frequência Absoluta; %= Frequência Relativa; G1= Glândula Mamária Torácica Cranial; G2= Glândula Mamária Torácica Caudal; G3= Glândula Mamária Abdominal Cranial; G4= Glândula Mamária Abdominal Caudal; G5= Glândula Mamária Inguinal.

DISCUSSÃO

O envolvimento do nódulo linfático em pacientes veterinários tem se demonstrado um fator prognóstico forte em tumores da glândula mamária, melanoma maligno, osteossarcoma, carcinoma primário do pulmão, sarcoma de células sinoviais e mastocitoma dentre outros. Assim, existe uma indicação clara para a adaptação de técnicas de localização e avaliação de LS para o uso em pacientes veterinários. Dada a importância prognóstica do comprometimento linfonodal em tumores como o carcinoma da glândula mamária, osteossarcoma, sarcoma de células sinoviais e mastocitomas, a avaliação do LS deve ser incorporada à prática clínica de rotina, de modo a melhorar a avaliação clínica de pacientes oncológicos veterinários (4).

Apesar da busca incessante por novos fatores prognósticos no câncer de mama, o comprometimento dos linfonodos axilares e inguinais permanece como principal fator preditivo de recidivas e metástases. Em humanos a linfadenectomia foi considerada durante décadas, não só como elemento prognóstico, mas também como importante recurso terapêutico, pela baixa incidência de recidivas após o procedimento (1 a 3%) (5).

Lana et al. (6) defendem que os linfonodos axilares são raramente envolvidos em casos de câncer de mama em cadelas e que não devem ser removidos profilaticamente. Atualmente, preconiza-se que glânglios axilares fixos, aderidos e com aumento de volume sejam removidos completamente em raras situações. Porém, os linfonodos axilares com comprometimento metastático deste estudo não apresentaram quaisquer das alterações descritas anteriormente, ou seja, aparentavam-se macroscopicamente saudáveis. Caso tais linfonodos não tivessem sido expirpados haveria um provável prejuízo à qualidade de vida desses animais, assim como manifestação precoce de doença metastática. Apesar disso, não é possível afirmar com convicção, pois esses animais não foram acompanhados posteriormente à alta cirúrgica. A literatura afirma, ainda, que o linfonodo inguinal deve ser removido quando

aumentado ou citologicamente positivo para o câncer de mama ou quando a glândula 5 for removida, pois está intimamente associado a essa glândula. Neste estudo, todos os linfonodos inguinais superficiais foram removidos entremeados no tecido adiposo próximo à glândula inguinal e não apresentavam alterações macroscópicas.

Na prática clínica veterinária, faltam diretrizes bem estabelecidas para a avaliação do LS. Os linfonodos são geralmente puncionados para citopatologia ou submetidos a biópsia somente se sensivelmente aumentados, levando a um estadiamento da doença impreciso. A relação entre o tamanho do linfonodo e a metástase linfonodal não é confiável o suficiente para o estadiamento clínico preciso de cães com melanoma (6,7). E no presente estudo, observou-se que para cadelas com tumor de mama essa relação também não é confiável, visto que nenhum linfonodo do estudo encontrava-se sensivelmente aumentado e, mesmo assim, havia ocorrido metástase para 4,55% dos LA e 11,36% dos LIS ipsilaterais às cadeias com neoplasia maligna.

A remoção do linfonodo aumentado pode ser equivocada, pois o gânglio aumentado também é um indício provável de reatividade, além de metástase. Assim, a exérese de um linfonodo reativo pode significar a remoção de uma barreira imune à disseminação tumoral por via linfática.

As metástases são resultado da boa adaptação das células cancerígenas em um novo microambiente, requerendo propriedades adaptativas tanto das células do tumor de origem como do próprio local de instalação do tumor secundário. A grande maioria das células metastáticas é destruída por apoptose ou pela ação lítica de células citotóxicas (8). Desta forma, para estabelecerem um novo crescimento em outro órgão, é preciso que as células metastáticas não sejam destruídas pelo sistema imune. Neste trabalho, a resposta imune foi avaliada pelo nível de reatividade em linfonodo, estando presente na maioria dos LS.

Aparentemente, os linfonodos inguinais ipsilaterais a glândulas acometidas por lesões não neoplásicas epiteliais tendem a apresentar grau um pouco maior de reatividade do que os axilares, conforme se pode constatar na tabela 1, em que, dos 6 linfonodos axilares relacionados a lesões deste tipo, 4 não apresentaram alterações histopatológicas e 2 apresentaram baixa reatividade. Já dos 6 linfonodos inguinais, dos mesmos animais estudados, somente dois não apresentaram alterações, três apresentaram baixa reatividade e um se mostrou moderadamente reativo.

Observando-se a distribuição de glândulas acometidas por lesões não neoplásicas únicas, nas tabelas 2 e 3, constata-se certo equilíbrio da quantidade de linfonodos com baixa reatividade e ausência de alterações, com uma leve tendência dos linfonodos inguinais a apresentarem maior reatividade. Essa tendência independe da glândula acometida. Neste aspecto o estudo ficou limitado, pois a incidência de lesões deste tipo na glândula 5 foi maior, restando um único caso para cada uma das glândulas 3 e 4.

Analisando as tabelas 2 e 4, observa-se que independentemente de terem ocorrido neoplasias benignas únicas ou múltiplas, o número de linfonodos axilares reativos foi elevado. Entre os linfonodos relacionados a neoplasias benignas únicas, somente em 1 de 11 linfonodos não ocorreu reatividade, enquanto no grupo de linfonodos relacionado a lesões múltiplas, não foi constatada reatividade em 2 de 13 linfonodos axilares. Analisando as tabelas 3 e 5, verifica-se que a reatividade dos linfonodos inguinais ipsilaterais a lesões neoplásicas benignas múltiplas tendem a ser mais reativos do que aqueles relacionados a neoplasias benignas únicas. Em um grupo de 13 linfonodos inguinais relacionados a

neoplasias benignas únicas, não ocorreu nenhum caso de reatividade intensa e somente 2 de moderada reatividade, enquanto 3 linfonodos não apresentaram reatividade alguma. Quando analisados 17 linfonodos inguinais ipsilaterais a lesões neoplásicas benignas múltiplas, constatou-se que em somente 1 não foi encontrado reatividade alguma, ou seja a proporção de LIS reativos relacionados a neoplasias benignas múltiplas atingiu 94,12%, enquanto aqueles relacionados a neoplasias benignas únicas representava 76,92% dos casos. Acrescenta-se ainda, que ocorreram 3 casos de elevada reatividade e 4 de moderada reatividade de linfonodos relacionados a neoplasias benignas múltiplas.

Constata-se nas tabelas 2, 3, 4 e 5, que há uma tendência à reatividade semelhante entre os linfonodos inguinais e axilares ipsilaterais a neoplasias malignas. Esta proporção atinge 75,95% para os LIS e 77,05% para os LA. Outro dado importante constatado é que, no grupo analisado, ocorreu metástase para 3,27% dos linfonodos axilares e 10,12% para os linfonodos inguinais, demonstrando uma tendência a um maior número de metástases para linfonodos inguinais, quando comparados a linfonodos axilares, quando ambos estão relacionados a neoplasias malignas.

Observando as tabelas 2 e 4, observa-se que a proporção de linfonodos axilares reativos relacionados a neoplasias malignas únicas era de 42,1% e que esta proporção atingiu 89,3%, quando analisados os casos de neoplasias malignas múltiplas. A análise do número de metástase indicou acometimento de somente 2 linfonodos, ou seja, 4,25%.

A análise das tabelas 3 e 5 indica que a proporção de linfonodos inguinais reativos relacionados a neoplasias malignas únicas era de 80% e que esta proporção atingiu 86,1%, quando analisados os casos de neoplasias malignas múltiplas. A análise das relações entre localização das glândulas, número de neoplasias e número de metástases ficou comprometida pela pouca ocorrência desta última, mas quando comparado aos linfonodos axilares, os linfonodos inguinais demonstram uma maior tendência a sofrer metástase de neoplasias malignas, tendo atingido a proporção de 13,11% (8/61) de acometimento metastático, contra 4,25% (2/47) dos linfonodos axilares.

No estudo de Oliveira Filho et al. (9), os tipos histológicos mais prevalentes nas metástases para linfonodos foram: carcinoma simples (50%), carcinosarcoma (25%), tumor misto maligno (8,3%), carcinoma complexo (8,3%) e carcinoma em tumor misto (8,3%). Já no presente estudo, foram carcinoma simples túbulo-papilar (42,86%; 3/7) e carcinoma em tumor misto (57,14%; 4/7).

Em medicina humana, observa-se que, para tumores malignos com até 1,0 cm de diâmetro, a avaliação histopatológica de rotina demonstra comprometimento linfonodal em 5 a 17% das pacientes. Para tumores entre 1,1 e 2,0 cm, o comprometimento linfonodal axilar é de 30% (10). Em 4,55% (2/44) das pacientes com neoplasia mamária maligna constatou-se comprometimento metastático em LA e o diâmetro de ambos os tumores primários era de cerca de 4,0 cm. Já os LIS apresentaram metástases em 11,36% (5/44) dos casos de neoplasia maligna e os tamanhos dos tumores primários variaram de 3,0 a 5,0 cm de diâmetro. Talvez a incidência de metástases esteja subestimada nesse estudo e o emprego de técnicas de imuno-histoquímica para detecção de metástases ocultas contribua para aumentar esse diagnóstico.

CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que ocorreram metástases com maior frequência para LIS, quando comparados a LA. Essa incidência pode estar subestimada e o emprego de técnicas de imuno-histoquímica pode contribuir para aumentar o diagnóstico de micrometástases em LS. Além disso, há uma tendência dos LIS a apresentarem mais reatividade do que os axilares nos casos de lesões mamárias não neoplásicas ou neoplásicas, sendo que nas últimas essa tendência é mais evidente.

REFERÊNCIAS

1. Owen LN. Classification of tumors in domestic animals. Geneva: World Health Organization; 1980.
2. Campos MLC, Repetti CSF, Hataka A, Maiante AA, Scorsato PS. Pesquisa do linfonodo sentinela através da administração de corante azul de metileno em cães portadores de neoplasias. *Nosso Clin.* 2007;10(56):18-34.
3. Cassali GD, Lavallo GE, Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli A, Estrela-Lima A, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol.* 2011;4(2):153-80.
4. Tuohy JL, Milgram J, Worley DR, Dernell WS. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. *Vet Comp Oncol.* 2009;1(7):81-91.
5. Barbosa EM, Francisco AARF, Neto JTA, Alves EMFA, Tavares MGM, Góes JCS. Fatores clínico-patológicos de predição do acometimento axilar em pacientes com metástases de câncer de mama no linfonodo sentinela. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(3):144-9.
6. Lana SE, Rutterman GR, Withrow SJ. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology.* 4th ed. Missouri: Elsevier Inc; 2007. p.864.
7. Gorbello C, Corrata Y. Canine mammary tumors: an endocrine clinical approach. *Compendium.* 2001;23(8):705-10.
8. Piacentini AB, Menezes H. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. *Rev Saude Pesqui.* 2012;5(3):593-604.
9. Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, Marques BMFPP, Figuera RA, Irigoyen LF, et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(2):177-85.
10. Quadros LGA, Gebrim LH. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(3):158-64.

Recebido em: 07/05/2015

Aceito em: 11/07/2016

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA A DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM REBANHOS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) DO ESTADO DO PARÁ

René Ribeiro da Silva¹
Silvio Orlan de Castro Chaves¹
Onel Solano Garcia²
Hilma Lúcia Tavares Dias³

RESUMO

A diarreia viral bovina é uma enfermidade infectocontagiosa que afeta os bovídeos, causada por um vírus do gênero *Pestivirus*. As manifestações clínicas vão desde infecções agudas até alterações reprodutivas, incluindo infecções pré-natais capazes de levar ao quadro denominado “Doença das mucosas”. O uso de testes diagnósticos indiretos pode indicar o contato prévio dos animais com o vírus, direcionando medidas de controle para ocasionais infecções no rebanho bubalino. Desta forma, 805 amostras de sangue de bubalinos de 44 rebanhos, provenientes de 13 municípios do estado do Pará foram submetidas ao Ensaio imunoenzimático indireto, para detectar a presença de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Verificou-se que 113 (14%) animais, 24 (54,4%) rebanhos apresentavam anticorpos para BVDV e em 77% dos municípios examinados houve pelo menos um animal reagente. A diferença encontrada entre as frequências de ocorrência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina quando comparada as mesorregiões do estado, sugere que existem diferentes fatores envolvidos na exposição dos animais nos diferentes rebanhos. Estudos relacionados a fatores de risco são imprescindíveis para esclarecer tais divergências e determinar quais são as medidas de controle mais indicadas.

Palavras-chave: bubalinos, vírus da diarreia viral bovina, ELISA, Pará.

ANTIBODIES AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) HERDS FROM PARÁ STATE

ABSTRACT

The bovine viral diarrhea is an infectious disease that affects bovines caused by a virus of the genus *Pestivirus*. The clinical manifestations ranging from acute infection to reproductive alterations, including prenatal infections capable of leading to the condition known as "mucosal disease". The use of indirect diagnostic tests may indicate prior contact with the animal virus, directing control measures to occasional infections in buffalo herd. Thus, 805 blood samples from 44 herds of buffaloes, from 13 municipal districts in the state were subjected to indirect ELISA to detect the presence of antibodies to bovine viral diarrhea virus in buffaloes of Para. It was observed that 113 (14%) animals, 24 (54.4%) herds had antibodies to BVDV and in 77% of municipal districts were examined at least one buffalo seropositive.

¹ Médico Veterinário, Fiscal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

² Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ.

³ Médica Veterinária, Professora Associado II, lotada no Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural da Universidade Federal do Pará, área de Medicina Veterinária Preventiva. Contato para correspondência.

The difference between the frequencies of occurrence of antibodies against BVDV compared the regions state, suggests that there are different factors involved in the exposure of animals in different herds. Studies related to risk factors are essential to clarify these differences and determine which the most suitable control measures are.

Keywords: buffalo, bovine viral diarrhea virus, ELISA, Pará.

ANTICUERPO CONTRA LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVDV) EN GANADO BUFALO (*BUBALUS BUBALIS*) ESTADO PARA, BRASIL

RESUMEN

La diarrea viral bovina es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los bovinos, y es causada por un virus del género *Pestivirus*. Las manifestaciones clínicas van desde la infección aguda hasta alteraciones reproductivas, incluyendo infecciones prenatales, capaces de conducir a una enfermedad conocida como "enfermedad de las mucosas". El uso de pruebas diagnósticas indirectas puede indicar un contacto inicial de los animales con el virus, direccionando medidas de control para infecciones eventuales de un rebaño de búfalos. Por esta razón, fueron sometidos a la prueba de Ensayo Inmunoenzimático Indirecto - ELISA, 805 muestras de sangre de 44 rebaños de búfalos, provenientes de 13 municipios del Estado de Pará, con el objetivo de detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en búfalos de Pará. Se observó que 113 (14%) animales, 24 (54,4%) rebaños, tenían anticuerpos para el VDVB y en el 77% de los municipios que se examinaron hubo al menos un animal positivo. La diferencia entre las frecuencias de aparición de anticuerpos contra BVDV cuando se compararon las diferentes regiones del estado, sugiere que hay diferentes factores que intervienen en la exposición de los animales en diferentes rebaños. Estudios relacionados con los factores de riesgo son esenciales para aclarar estas diferencias y determinar cuáles son las medidas de control más adecuadas.

Palabras clave: búfalo, virus de la diarrea viral bovina, ELISA, Pará.

INTRODUÇÃO

A diarreia viral bovina ou Bovine Virus Diarrhoea (BVD) pode provocar manifestações clínicas que vão desde infecções agudas até alterações reprodutivas, com destaque para baixa eficiência reprodutiva, infertilidade, mortes embrionárias, repetição de cio, abortos, nascimentos de bezerros com defeitos congênitos e desenvolvimento retardado (1,2,3), incluindo infecções pré-natais capazes de levar a um quadro possivelmente fatal denominado "Doença das Mucosas".

No final da década de setenta e início dos anos oitenta, começava-se a evidenciar a circulação do vírus da Diarreia Viral Bovina em bubalinos (4,5).

Flores et al. (6) ressaltam que nos países livres de Febre Aftosa, BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e programas. Em bubalinos no Brasil, Lage et al. (7) ao efetuarem um levantamento sorológico, chegaram a uma prevalência da infecção de 52,7%. No continente africano e asiático, estudos mostraram uma soroprevalência de 52% nos búfalos examinados (8,9,10).

A transmissão da enfermidade pode ocorrer normalmente por contato direto com portadores (corrimento nasal, saliva, sêmen, fezes, urina e leite); via transplacentária; por meio de vacinas vivas modificadas ou vacinas contra outras enfermidades que estejam contaminadas com BVDV; soro fetal que é usado em transferência de embriões ou produção de vacinas (2,11,12). Medidas de manejo tais como a compra de animais sem o conhecimento do histórico sanitário ou de vacinação, aquisição de fêmeas carregando fetos persistentemente infectados (PI), pobre esquema de vacinação e concentração de um grande número de animais em áreas relativamente pequenas, podem levar a uma fácil disseminação do BVDV (13,14,15).

De acordo com Sandvik (16), os ensaios imunoenzimáticos são métodos diagnósticos capazes de detectar praticamente qualquer molécula imunoreativa. São amplamente utilizados para exames da infecção por BVDV em grandes rebanhos, pois não necessitam cultura celular. Os resultados podem ser obtidos em algumas horas. Os testes são convenientes, principalmente, para sangue e leite; a leitura é automatizada excluindo erros subjetivos. Outros testes como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) e a imunohistoquímica são ferramentas importantes na investigação da circulação das estirpes promotoras de infecções naturais tanto em bovinos quanto em bubalinos (17,18,19).

De acordo com Fredriksen et al. (20) e Beaudeau et al. (21), os testes ELISA indireto que utilizam a proteína não estrutural, presente em todas as amostras virais, tem um papel extremamente importante na sorologia da BVD, já que demonstrariam com eficiência os anticorpos originados por uma infecção, chegando a uma sensibilidade e especificidade de 96,9 % e 97,3 %, respectivamente. Os estudos soropidemiológicos para BVD no mundo e no Brasil em sua maioria foram realizados utilizando a prova de soroneutralização (SN), um teste de especificidade e sensibilidade bastante comprovadas. No entanto, Flores et al. (22) demonstraram que testes de SN utilizando vírus de apenas um genótipo podem resultar em um número significativo de falsos-negativos.

Tendo em vista que existem poucas informações a respeito da diarreia viral bovina em rebanhos bubalinos na região norte, a presente pesquisa teve como objetivo evidenciar a presença de anticorpos contra BVDV em bubalinos criados no estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas, por conveniência, 805 amostras de sangue de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, Carabao, Jafarabadi e mestiços, ambos os sexos, com idade superior a doze meses, pertencentes a 44 rebanhos, três mesorregiões e 13 municípios do estado do Pará.

As amostras de sangue foram colhidas pela punção da veia jugular com seringa tipo Vacutainer e em seguida mantidas em refrigeração e transportadas até o laboratório, onde foram centrifugadas e os soros armazenados em tubos tipo *Eppendorf* a -20°C até o momento do uso.

Para a detecção de anticorpos contra BVDV, foi utilizado um teste ELISA indireto (“Bovine Vírus Diarrhoea Virus BVDV-ab ELISA kit”⁴). Todos os procedimentos foram executados segundo a recomendação do fabricante. Os soros foram diluídos em duplicata na diluição de 1:25. Nas placas, já sensibilizadas com o antígeno NS2-3, foram adicionados 4 μL de soro positivo e soro negativo em orifícios da microplaca e 4 μL dos soros teste nos

⁴ SVANOVA TM Biotech S – 751 83 Uppsala, Suécia

orifícios ordenados para este fim em duplicata. Após 1 hora de incubação à temperatura de 37°C, as placas foram submetidas a um ciclo de três lavagens e posteriormente foram acrescentados 100 µL de conjugado em todos os orifícios e incubou-se a 37°C por 1 hora, novamente. Em seguida, outro ciclo de lavagens e, finalmente, a adição do substrato em todos os orifícios seguida de nova incubação por 15 minutos. Adicionou-se 50 µL de solução “stop” H₂SO₄ 2M em todos os orifícios, para posterior leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro de 450 nanômetros.

Para fins de análise estatística, os municípios foram agrupados em três mesorregiões, segundo o mapa político do estado. Os resultados obtidos nas três mesorregiões foram comparados pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($p=0,05$), procurando-se determinar diferenças entre as regiões estudadas (23).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas mesorregiões nordeste e metropolitana de Belém os bubalinos eram vermifugados e vacinados contra febre aftosa, clostridioses e raiva. No entanto, nos animais pertencentes à mesorregião do Marajó não se conhecia o histórico de sanidade dos animais. Nos rebanhos bubalinos analisados não se adotava a vacinação contra BVDV. O rebanho foi considerado positivo quando se detectou pelo menos um animal reagente para BVDV.

Os resultados obtidos (Tabela 1) demonstraram que anticorpos para a diarreia viral bovina ocorrem nos rebanhos bubalinos dos municípios do estado do Pará. Dos treze municípios investigados, 10 (77%) apresentaram pelo menos um animal positivo para anticorpos BVDV.

Tabela 1. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de animais positivos e negativos para anticorpos BVDV em 13 municípios do estado do Pará.

| Município | Animais examinados | Animais negativos | % | Animais positivos | % |
|----------------------|--------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Belém | 30 | 29 | 96,64 | 1 | 3,33 |
| Benevides | 15 | 15 | 100 | 0 | 0 |
| Bujará | 12 | 12 | 100 | 0 | 0 |
| Santa Isabel do Pará | 84 | 75 | 89,29 | 9 | 10,71 |
| Castanhal | 54 | 44 | 81,48 | 10 | 18,52 |
| Mojú | 128 | 104 | 81,25 | 24 | 18,75 |
| Peixe-boi | 71 | 56 | 78,87 | 15 | 21,13 |
| Cachoeira do Arari | 52 | 48 | 92,31 | 4 | 7,69 |
| Chaves | 164 | 150 | 91,46 | 14 | 8,54 |
| Ponta de Pedras | 18 | 18 | 100 | 0 | 0 |
| Salvaterra | 32 | 21 | 65,62 | 11 | 34,38 |
| Soure | 54 | 41 | 75,93 | 13 | 24,07 |
| Santa Cruz do Arari | 91 | 79 | 86,81 | 12 | 13,19 |
| Total | 805 | 692 | 85,96 | 113 | 14,04 |

A análise dos dados obtidos neste estudo por mesorregiões revelou diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=7,7$, G.L=2, $p=0,02$) quando se comparam os resultados obtidos entre as três mesorregiões.

Observou-se que entre a mesorregião metropolitana de Belém e Marajó não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=1,02$, G.L=1, $p=0,31$), entretanto, entre

a mesorregião metropolitana de Belém e a mesorregião nordeste foi encontrada diferença estatística significativa ($\chi^2=6,75$, G.L=1, $p=0,009$) e entre a mesorregião do Marajó e a mesorregião nordeste constatou-se diferença estatística significativa ($\chi^2=4,32$ G. L=1, $p=0,03$).

Estudo semelhante foi realizado por Langoni et al. (24) em São Paulo, ao analisar 405 amostras sanguíneas de bovinos por meio de um ELISA indireto comercial, em que foi dividido os municípios em três regiões, sendo que não foram encontradas diferenças significativas (33,3%) dos animais reagiram positivamente. No entanto, na Venezuela, Obando et al. (25) também utilizando um ELISA indireto, evidenciaram 36% de soropositividade, encontrando diferenças altamente significativas entre as cinco regiões estudadas.

A ocorrência de animais reagentes para BVDV variou entre 10,26% e 19,60% (Tabela 2). Esses percentuais de bubalinos caracterizados reagentes para BVD foram inferiores ao registrado em outras regiões do Brasil, Minas Gerais (31,1% e 52,7%), São Paulo (39,2%), Pernambuco (72,8%), Rio Grande do Sul (56%) e Goiás (34,5%) (7,26,27,28,29).

Tabela 2. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de bubalinos positivos e negativos para anticorpos BVDV nas mesorregiões estudadas.

| Mesorregiões | Positivos | | Negativos | | χ^2 | p |
|--------------------------------|------------|--------------|------------|--------------|----------|------|
| | f | % | f | % | | |
| Metropolitana de Belém (n=195) | 20 | 10,26b | 175 | 89,74 | 7,7 | 0,02 |
| Marajó (n=411) | 54 | 13,14b | 357 | 86,86 | | |
| Nordeste (n=199) | 39 | 19,60a | 160 | 80,40 | | |
| TOTAL | 113 | 14,04 | 692 | 85,96 | | |

n Número de animais examinados por mesorregião

% seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste χ^2 a 0,05

Na análise dos rebanhos, verificou-se que de 44 rebanhos examinados, 24 (54,5%) apresentavam no mínimo um animal soropositivo (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências absolutas (f) e relativas (%) de rebanhos bubalinos positivos e negativos para anticorpos BVDV nas mesorregiões estudadas.

| Mesorregiões | Positivos | | Negativos | | χ^2 | p |
|-------------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------|------|
| | f | % | f | % | | |
| Metropolitana de Belém (n=11) | 06 | 54,5 | 05 | 45,4 | 1,0 | 0,60 |
| Marajó (n=26) | 13 | 50 | 13 | 50 | | |
| Nordeste (n=7) | 05 | 71,4 | 02 | 28,5 | | |
| Total | 24 | 54,5 | 20 | 45,4 | | |

n= Número de rebanhos examinados por mesorregião

Levando-se em consideração que rebanhos infectados não apresentam o mesmo padrão regional de disseminação do BVDV (14), as diferenças observadas na literatura e, aquelas observadas nas regiões estudadas, tais como, influências climáticas, manejo, tamanho dos rebanhos, virulência do BVDV, poderiam explicar as discrepâncias observadas.

A mesorregião metropolitana de Belém e a região do Marajó apresentam clima e manejo distintos, portanto diferenças poderiam ocorrer quando os dados fossem confrontados, entretanto, estas diferenças foram destituídas de significado estatístico.

O Marajó apresenta tipo climático Ami, caracterizado pela ocorrência de duas estações bem distintas, uma seca, de julho a dezembro, e outra chuvosa, de janeiro a junho (30). Os animais são criados sem nenhuma tecnologia e vivem principalmente do pastejo, o que acarreta baixa produtividade. Ocorre a predominância de manejo extensivo, o que proporciona

uma maior separação dos animais, sugerindo um obstáculo à plena dispersão do vírus, já que o mesmo é bastante sensível às condições ambientais (2,31).

Na mesorregião metropolitana de Belém o tipo climático é do Afi, sem um período seco definido e o tipo de criação era semi-intensivo, ocorrendo uma maior aglomeração dos animais. Entretanto, nas propriedades analisadas o manejo sanitário era relevante, dificultando a disseminação do agente viral.

A região metropolitana da cidade de Belém e a região nordeste do estado, apesar de apresentarem em geral, os mesmos tipos climáticos, não demonstraram um padrão de manejo sanitário, dentro do sistema de criação semi-intensivo. Assim, diferentemente do observado nas fazendas da região metropolitana, as propriedades da mesorregião nordeste o manejo sanitário era praticamente inexistente e, nestas fazendas, a aglomeração dos animais pode ter facilitado a transmissão do vírus pelos animais infectados (11,15,32), podendo assim justificar, não só a diferença entre a área metropolitana de Belém (10,26%) e a região nordeste (19,60%), mas também a encontrada entre a região nordeste e Marajó (13,14%).

Apesar do estado do Pará ser detentor de um rebanho bubalino estimado em 507.882 cabeças (33) e da atividade estar em expansão, o controle sanitário dos animais ainda é deficiente nas áreas estudadas. Assim, animais são comprados e vendidos sem qualquer tipo de quarentena ou histórico de sanidade e, em muitos casos, a separação física entre as propriedades é precária, o que certamente contribui para a circulação do BVDV nos rebanhos analisados. Vale ressaltar, a possibilidade da existência de bubalinos PI como principal fonte de infecção e reservatório do vírus (19).

O teste ELISA utilizado nesse trabalho era de natureza comercial, sendo o mesmo empregado pela Noruega no seu programa de erradicação da doença em bovinos (34). Os estudos soroepidemiológicos para BVD no mundo e no Brasil em sua maioria foram realizados utilizando a prova de soroneutralização, um teste de sensibilidade e especificidade bastante comprovadas. No entanto, Flores et al. (22) demonstraram que testes de SN utilizando vírus de apenas um genótipo podem resultar em um número significativo de falso-negativos. O teste ELISA, empregado no presente estudo mostrou-se como uma alternativa para o diagnóstico sorológico de grandes efetivos bubalinos, capaz de detectar anticorpos específicos contra o BVDV e fornecer dados preliminares sobre a doença no estado.

CONCLUSÃO

A diferença encontrada entre as frequências de ocorrência de anticorpos contra BVDV quando comparada as mesorregiões do estado, sugere que existem diferentes fatores envolvidos na exposição dos animais nos diferentes rebanhos. Estudos relacionados a fatores de risco são imprescindíveis para esclarecer tais divergências e determinar quais são as medidas de controle mais indicadas.

REFERÊNCIAS

1. Duffell SJ, Harkness JW. Bovine virus diarrhoea–mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec.* 1985;117:240-5.
2. Corrêa WM, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos animais domésticos*. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1992. p.539-46.
3. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologico.* 2003;31:137-43.
4. Hamblin C, Hedger RS. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/ mucosal disease virus in African Wildlife. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1979;2:295-303.

5. Ghaffar SA, Ata FA. Bovine virus diarrhoea in Egypt. *Vet Rec.* 1982;110:566.
6. Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehe PM, Alfieri AA, Pituco EM. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico situação atual e perspectivas. *Pesqui Vet Bras.* 2005;25:125-34.
7. Lage AP, Castro RS, Melo MI, Aguiar PH, Barreto Filho JB, Leite RC. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais state, Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1996;49:195-7.
8. Akhatar S, Asif M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. *Trop Anim Health Prod.* 1996;28:207-12.
9. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *J Vet Med.* 1998;45:345-51.
10. Sudharshana KJ, Suresh KB, Rajasekhar M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. *Rev Sci Tech.* 1999;18:667-71.
11. Leite RC. Diarréia bovina à vírus. In: *Anais do I Simpósio Pfizer Sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos*; 1996; Guarulhos. Guarulhos: Laboratório Pfizer; 1996. p.29-31.
12. Gard JA, Givens MD, Stringfellow D. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology.* 2007;68:434-42.
13. Dubovi EJ. Bovine viral diarrhoea virus. In: *Anais do Encontro Internacional Sobre Herpesvírus Bovino (Tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*; 1998; Santa Maria. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 1998. p.1-19.
14. Ezanno P, Fourichon C, Viet AF, Seegers H. Sensitivity analysis to identify key-parameters in modelling the spread of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. *Prev Vet Med.* 2007;80:49-64.
15. Stahl K, Lindberg A, Rivera H, Ortiz C, Moreno-López J. Self clearance from BVDV infections: a frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. *Prev Vet Med.* 2008;83:285-96.
16. Sandvik T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 1999;64:123-34.
17. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol.* 1994;136:309-23.

18. Cortez A, Castro AMG, Heinemann MB, Soares RM, Leite RC, Scarcelli E, et al. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58:1226-8.
19. Craig MI, Venzano A, Moris WE, Jimenez L, Julia S, Capellino F, et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci*. 2008;85:194-6.
20. Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*. 1999;144:111-4.
21. Beaudeau F, Assié S, Seegers H, Belloc C, Sellal E, Joly A. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet Rec*. 2001;149:236-40.
22. Flores EF, Weiblen R, Gil LHV, Tobias FL, Lima M, Garcez DC, et al. Diversidade antigênica de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52:18-22.
23. Beiguelman B. Curso prático de bioestatística. 4a ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética; 1996.
24. Langoni H, Paes AC, Silva AV, Tonin FB, Kung D. Inquérito sorológico para a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) e Diarreia a Vírus dos Bovinos (DVB). *Vet Not*. 1999;5:121-4.
25. Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-Lopez J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med*. 1999;41:271-8.
26. Castro RS, Melo LEH, Abreu SRO, Muniz AMM, Albuquerque APS. Anticorpos neutralizantes contra Pestivirus em soros bovinos do Estado de Pernambuco. *Pesqui Agropecu Bras*. 1993;28:1327-31.
27. Canal CW, Strasser M, Hertig C, Masuda A, Peterhans E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol*. 1998;63:85-97.
28. Brito WMED, Souza WJ, Vieira S, Linhares DCL, Barbosa ACVC, Alfaia BT. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. *Virus Res*. 2002;7:144.
29. Dias FC, Alexandrino B, Medeiros ASR, Dias EC, Buzinaro MG, Samara SI. Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV-1 e o BVDV-2 em rebanhos bovinos de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. *Ars Vet*. 2011;27:161-7.

30. Bastos TX, Rocha EJP, Rolim PAM, Diniz TDAS, Santos ECR, Obre RAA, et al. O estado atual dos conhecimentos de clima da Amazônia brasileira com finalidade agrícola. In: Anais do I Simpósio do Trópico Úmido; 1984; Belém. Belém: Embrapa-CPATU; 1986. p.19-43.
31. Depner K. Thermal and pH stability of pestiviruses. Rev Sci Tech. 1992;11:885-93.
32. Leite RC. Controle de Diarréia Bovina à Vírus (DBV) e Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina (IBR). Rev Bras Reprod Anim. 1999;23:531-5.
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária municipal [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2013 [cited 2015 May 09]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pa&tema=pecuaria2013>.
34. Valle PS, Skjerve E. Time to first calving and calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway. Prev Vet Med. 2001;51:17-36.

Recebido em: 20/05/2015

Aceito em: 11/07/2016

AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA INATIVAÇÃO DE *LEISHMANIA* EM SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUSÃO¹

Soraya Regina Sacco²
Cesar Rodrigo de Souza Surian²
Rodrigo Costa da Silva²
Hélio Langoni²
Mary Marcondes³
Raimundo Souza Lopes²

RESUMO

É de extrema importância para a medicina transfusional que haja segurança no procedimento de transferência de hemocomponentes, minimizando a ocorrência da transmissão de patógenos. O presente trabalho investigou a eficiência da luz ultravioleta e riboflavina na inativação de *Leishmania infantum chagasi* em amostras de sangue canino, colhidas em bolsas plásticas para transfusão. Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizada PCR convencional de sangue de bolsas colhidas de animais sintomáticos, positivos na punção aspirativa de linfonodo e na RIFI (título 1:640), procedentes do CCZ de região epidêmica para a enfermidade. Após 21 dias de armazenamento em temperatura de 4°C, o sangue canino parasitado foi adicionado de riboflavina na concentração final de 50µM. Posteriormente, a bolsa foi colocada no iluminador a um comprimento de onda de 365 nm de luz UV por 30 e 45 minutos, sendo mantida sobre um homogeneizador de bolsa de sangue. Para comprovar a inativação, foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e adultos. Sete animais foram inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete, com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete, com sangue após tratamento com riboflavina associado à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado 1: G_{T30}) e sete, com sangue após tratamento com riboflavina associado à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado 2: G_{T45}). Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters no Infectório da área de Zoonoses e Saúde Pública da FMVZ, Unesp, Botucatu-SP, e acompanhados clinicamente. O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares. Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso esterno, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR convencional e qPCR. O sangue parasitado não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento (21 dias). Os hamsters inoculados com sangue tratado com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos apresentaram PCR positiva, apesar dos animais não apresentarem sinais clínicos da enfermidade. Na qPCR, pode-se identificar que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária, porém, não eliminou completamente os parasitas, demonstrando a importância de testes laboratoriais para diagnóstico da leishmaniose na seleção de doadores de sangue.

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniose, luz UV, vitamina B2, sangue.

¹ Auxílio à Pesquisa FAPESP.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP. 18618-000, Brasil. soraya_sacco@rocketmail.com.

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba, SP.

ACTION OF ULTRAVIOLET LIGHT AND RIBOFLAVIN IN THE INACTIVATION OF *LEISHMANIA* IN CANINE BLOOD STORED IN BAGS FOR TRANSFUSION

ABSTRACT

It is extremely important for the transfusion medicine the safety in blood components transfer procedure, minimizing the occurrence of pathogen transmission. This study investigated the efficiency of ultraviolet light and riboflavin in the inactivation of *Leishmania infantum chagasi* in canine blood samples collected in plastic bags for transfusion. To detect positive blood bags to be used in the experiment, it was performed conventional PCR of the bags collected from symptomatic animals, with positive aspiration of lymph node and IFA (title 1: 640), from an epidemic region for the disease. After 21 days of storage at 4°C, parasitized canine blood riboflavin was added to a final concentration of 50µM. Thereafter, the bag was placed in the illuminator at a wavelength of 365 nm UV light for 30 to 45 minutes and maintained over a homogenizer blood bag. To prove the inactivation, they were used 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), adult, male. Seven animals were inoculated with the blood without treatment (group leishmaniasis: GL); seven, with blood after the addition of riboflavin (riboflavin group: GRB); seven, with blood after treatment with riboflavin associated with ultraviolet light for 30 minutes (treated group 1: GT₃₀) and seven, with blood after treatment with riboflavin associated with ultraviolet light for 45 minutes (treated group 2: GT₄₅). The animals were kept for 120 days in boxes for hamsters in Infectorio of Zoonoses and Public Healthy, FMVZ, Unesp, Botucatu, and followed clinically. The blood of hamsters was collected by intracardiac puncture for realization of serological and molecular tests. Spleen, liver and bone marrow were extracted after the autopsy, were macerated, and the bone marrow obtained after maceration of the sternum, and DNA extraction was performed to make conventional PCR and qPCR. The parasitized blood has not lost the ability to cause infection after the storage period (21 days). The hamsters inoculated with blood treated with riboflavin and UV light for 30 and 45 minutes were PCR positive, while hamsters not showing clinical signs of the disease. In qPCR, it was identified the association of riboflavin with UV light had reduced the number of *Leishmania*, but did not completely eliminate the parasites, demonstrating the importance of laboratory diagnosis of leishmaniasis tests in the selection of dogs as blood donors.

Keywords: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniasis, UV light, vitamin B2, blood.

ACCIÓN DEL LUZ UV Y RIBOFLAVINA EN INACTIVACIÓN DA *LEISHMANIA* EN SANGRE CANINO MANTENIDO EN BOLSAS DE TRANSFUSIÓN

RESUMEN

Es extremadamente importante para la medicina de transfusión tener seguridad en procedimiento de transferencia de componentes de la sangre, lo que minimiza la aparición de transmisión de patógenos. Este estudio investigó la eficacia de la luz ultravioleta y riboflavina en la inactivación de *Leishmania infantum chagasi* en muestras de sangre de perros recogidos en bolsas de plástico para la transfusión. Para detectar bolsas de sangre positivos para ser utilizado en el experimento se realizó PCR convencionales de las bolsas tomadas de animales sintomáticos, la aspiración positiva de los ganglios linfáticos y IFA (título de 1: 640) a partir de CCZ Araçatuba-SP. Después de 21 días de almacenamiento a 4°C la sangre canina parasitada se añadió a riboflavina a una concentración final de 50µM. A partir de entonces, la bolsa fue colocada en el iluminador a una longitud de onda de 365 nm de luz UV durante 30 a 45 minutos y se mantuvo sobre uno homogeneizador de bolsa de sangre. Para demostrar la

inactivación se usaron 28 hámsteres (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos. Siete animales fueron inoculados con la sangre sin tratamiento (grupo de leishmaniasis: G_L); siete de sangre después de la adición de riboflavina (grupo de riboflavina: G_{RB}); siete de sangre después del tratamiento con riboflavina asociada con luz ultravioleta durante 30 minutos (grupo tratado 1: GT₃₀) y siete con la sangre después del tratamiento con riboflavina asociada con luz ultravioleta durante 45 minutos (grupo tratado 2: GT₄₅). Los animales se mantuvieron durante 120 días en cajas de los hámsters en Infectório de Zoonosis Área FMVZ, UNESP, Botucatu y seguidos clínicamente. La sangre de hámsters se recogió por punción intracardiaca para la determinación de las pruebas serológicas y moleculares. Bazo, hígado y médula ósea se extrajeron después de la autopsia, se maceraron, y la médula ósea obtenida después de la maceración del esternón, y la extracción de ADN se realizó para llevar a cabo PCR convencional y qPCR. La sangre parasitada no ha perdido la capacidad de producir la infección después del período de almacenamiento (21 días). Los hámsteres inoculados con sangre tratado con riboflavina y luz ultravioleta durante 30 y 45 minutos fueron PCR positiva, aunque los animales no presentaran signos clínicos de la enfermedad. En qPCR puede identificar que la combinación de riboflavina con luz UV redujo el número de *Leishmania*, la reducción de la carga parasitaria, pero no elimino completamente los parásitos, lo que demuestra la importancia del diagnóstico de laboratorio de pruebas de leishmaniasis en la selección de los donantes de sangre.

Palabras clave: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniasis, luz UV, vitamina B2, sangre.

INTRODUÇÃO

A transmissão de enfermidades infecciosas pela transfusão sanguínea é bem documentada em Medicina Veterinária. A triagem dos doadores para as principais doenças que podem ser veiculadas pelo sangue é de extrema importância para não piorar a condição clínica do receptor. Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência da enfermidade sem sinais clínicos evidentes em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes agentes permanecerem viáveis no sangue estocado (1,2).

Os procedimentos de inativação de agentes patogênicos têm uma ampla atividade antimicrobiana, preservando todos os componentes do sangue e representando uma abordagem proativa para a segurança do sangue. O desafio da inativação de patógenos é reduzir o maior número de potenciais agentes patogênicos do sangue, sem comprometer significativamente os constituintes celulares ou proteínas ou introduzir alguma toxicidade nova, carcinogenicidade, ou teratogenicidade (3).

As mais promissoras abordagens para a tentativa de inativação, até o momento, são métodos que têm por alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma de vírus, bactérias e protozoários (tratamento com riboflavina e luz ultravioleta, azul de metileno e Psoralen) (4).

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão pela associação riboflavina (RB) e luz UV tem se mostrado muito eficaz em estudos *in vitro* (5). O conhecimento do perfil toxicológico da riboflavina e de seus derivados, sua grande utilização na dieta, assim como o uso de um foto sintetizador eficaz na inativação de patógenos, torna este procedimento promissor para ser utilizado no sangue e seus derivados (6,7).

Sua ação como agente inativador em componentes lábeis tem sido extensamente estudada, com reduções de 4 a 6 log nos títulos de vírus (intra e extracelulares) e bactérias, sem efeitos consideráveis sobre as plaquetas ou fatores de coagulação (4). Cardo et al. (8), utilizando riboflavina e luz UV, obtiveram uma redução de 5 log de *Leishmania donovani infantum* em cinco de seis unidades de plasma e de 7 log na unidade restante. Além disto,

demonstrou uma redução de 5 log de *Leishmania* em cinco de seis unidades de plaquetas, e de 6 log na unidade restante.

A riboflavina (vitamina B2) participa em várias reações de óxido-redução celular, além de possuir importante papel na estrutura de várias enzimas. Por ser altamente solúvel, penetra rapidamente na célula. Desde a década de 60 já se conhecia a sua ação inativadora na presença de luz visível ou UV. Possui capacidade de agir como um fotossensibilizador causando danos seletivos aos ácidos nucleicos, após exposição à luz UV, sem se ligarem às células e proteínas (9). A RB se associa aos ácidos nucleicos e intercede um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação dos ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina, bem como a conversão da riboflavina ao seu fotoproduto lumichromo (10).

A utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico. Porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina (11). O número de lesões ocorrem com uma frequência de aproximadamente uma em cada 350 pares de base (bp) (12). O dano em ácido nucleico pode ser menos frequente em DNA mitocondrial, conforme mostrado por Janetzko et al. (13).

O presente trabalho investigou a eficácia do tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado, evitando que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de transfusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 caninos, adultos, de idade e sexo variável, sem raça definida, naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, sintomáticos, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de região epidêmica para a enfermidade.

A triagem dos animais foi realizada por exames parasitológicos: punção aspirativa do linfonodo poplíteo e esfregaço de ponta de orelha, com presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. Além disto, para selecionar os cães, foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect^{®4}, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp. Após isto, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *L. infantum chagasi* para avaliação do título de anticorpos do sangue das respectivas bolsas e todas as amostras apresentavam títulos de 1:640.

Os animais parasitologicamente positivos e sororeagentes, receberam uma pré-anestesia com acepromazina (0,055mg/kg/IV), seguida, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico (15mg/kg/IV); sendo, então, colhidos 450mL de sangue por punção da veia jugular. Com os cães ainda em plano anestésico, foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Depois da colheita as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas no refrigerador à temperatura de 4°C, durante 21 dias.

No protocolo de fotoinativação utilizado, as hemácias foram combinadas com uma solução de riboflavina a 500µM/L em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 50µM, com pH ajustado para 4,0 a 5,0, sendo preparada e autoclavada em frasco âmbar, conforme descrito por Ruane et al. (14) e Cardo et al. (15).

⁴ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104, USA.

Para avaliar a transmitância das bolsas a serem utilizadas durante o procedimento foram usadas duas marcas distintas (JP^{®5} e Fresenius Kabi^{®6} - FK) de bolsa tripla para transfusão, sendo medidas as transmitâncias da bolsa principal (hemácias) e das satélites (bolsas para plasma e plaquetas). O material que permitiu maior passagem da luz foi a bolsa de plasma da marca Fresenius Kabi[®], sendo esta a selecionada para o procedimento de fotoinativação no presente trabalho.

As bolsas foram fracionadas e 100 mL de sangue total após a adição da RB foram colocadas no iluminador DNA Workstation⁷ até atingir 60J/mL (16). A mistura foi exposta à luz UV na faixa de 365nm, conforme indica Goodrich et al. (17). O tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 30 e 45 minutos.

Seltsam e Müller (18) obtiveram melhores resultados na irradiação de luz UV quando, durante o procedimento, a bolsa de sangue estava sob agitação, por isso, durante o procedimento a bolsa esteve sob um homogeneizador de bolsa de sangue tipo gangorra modelo HOMBOL-061, Benfer⁸.

Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizado PCR convencional das bolsas colhidas dos animais do grupo leishmaniose.

O DNA foi extraído de 200µL do sangue coletado das bolsas, utilizando-se o Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare[®]), conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses e mantido a -20°C até a realização da técnica de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 10µM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf[®]) com o seguinte perfil de ciclagem: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 70°C durante 10 minutos. Para amplificação foram utilizados os *primers*:

LC14 250-273 (5' - CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3')

LC15 416-439 (5' - TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3')

Estes *primers* foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para o gene "*Leishmania infantum chagasi* kinetoplast minicircle DNA", AF169138.1 disponível [GenBank]. Nessa reação, o produto resultante apresentou 190 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *L. infantum chagasi*.

Os produtos amplificados foram identificados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Sendo utilizados como controles positivos DNAs da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*, e como negativos (água MilliQ + MIX-PCR). A visualização das bandas no gel e a fotodocumentação foram realizadas em transiluminação com luz ultravioleta (296nm).

Após a análise dos resultados, foi selecionada a bolsa de sangue número três, onde foi amplificado o DNA do parasita por PCR convencional durante todo o período de conservação (21 dias), com o objetivo de utilizar a bolsa do animal com a maior carga parasitária (43,04/µL). O animal apresentava-se sintomático no momento da colheita, com áreas de alopecia ao redor dos olhos, onicogribose e caquexia.

⁵ JP Indústria Farmacêutica S.A., Av. Presidente Castelo Branco 999. Ribeirão Preto/SP, Brasil.

⁶ Fresenius Kabi Brasil Ltda, Av. Marginal Projetada 1652, Fazenda Tamboré, Barueri, SP.

⁷ Locus Biotechnology - Locus, São Paulo, SP.

⁸ Benfer Produtos para laboratórios, Rua Padre Agostinho Poncet 74. São Paulo, SP.

Após a adição da riboflavina (RB) e após os tratamentos pela luz UV por 30 minutos e 45 minutos, as amostras se mantiveram positivas na PCR sendo, portanto, necessária à inoculação em hamster.

Foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos, que receberam por via intraperitoneal 3,5mL do sangue (2) obtido de cão com leishmaniose; sendo sete animais inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado I: G_{T30}) e sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado II: G_{T45}).

Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters⁹ no Infectório da área de Zoonoses e Saúde Pública da FMVZ-Unesp, Botucatu/SP, recebendo água e ração Presence[®] linha roedores¹⁰ *ad libitum*.

Os hamsters inoculados foram acompanhados clinicamente e sacrificados decorridos 120 dias, utilizando protocolo de Hochman et al. (19).

O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares. Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, para confecção de lâminas pelo método de aposição de tecido (*imprinting*), e subsequente coloração pela técnica de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp., sendo consideradas positivas caso apresentassem pelo menos uma forma amastigota fagocitada ou livre.

Em seguida, os órgãos (baço, fígado e osso) foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso esterno, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO).

O DNA foi extraído de 200 µL do sangue coletado, utilizando-se o IllustraTM Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, e de amostras de tecido dos hamsters (baço e fígado) utilizando-se IllustraTM Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit11. As amostras de osso foram extraídas utilizando-se o kit Multi-Source Axygen com prévia etapa de maceração em nitrogênio líquido. O material genético extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C, até o momento da realização das provas biomoleculares. Controles positivo (DNA da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*) e negativos (água MilliQ) foram adicionados a cada bateria de extração.

Os primers LC14 e LC15 utilizados foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para amplificar um fragmento de 190 pares de base (pb) do segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania infantum chagasi*, AF169138.1 - disponível [GenBank].

O DNA extraído das amostras de hamsters foi amplificado por meio de PCR em Tempo Real para a determinação da carga parasitária, por meio do sistema SYBR[®]Green, em termociclador StepOneTM Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão, foram utilizadas amostras de DNA de ATTC nas concentrações decrescentes de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ parasitas/mL, todas analisadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados com o Step OneTM Software v2.1¹¹. Para todas as análises considerou-se slope (-3,380 a -3,300), R² (0,982 a 0,999) e eficiência (98 a 104%) em intervalos aceitáveis para acurada análise dos resultados.

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e a comparação entre os grupos leishmaniose (G_L), riboflavina (G_{RB}), tratado 1 (G_{T30}) e tratado 2 (G_{T45}) foi realizada por meio

⁹ Caixa de polipropileno. Elo's Com. e Repres. de Aparelhos para Laboratórios de Biotérios Ltda.

¹⁰ Presence Nutrição Animal, Av. Professor Benedito Montenegro s/n, Bairro Betel, Paulínia/SP, 13140-000.

¹¹ Life Technologies, EUA.

de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias. Os valores da carga parasitária foram transformados em logaritmos, com o objetivo de atingir tanto a homogeneidade de variâncias, como a normalidade de distribuição. Para as características qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado. Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (20).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Próximo ao final do experimento (120 dias), os animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram emagrecimento aparente, quando comparados aos demais grupos.

Durante a necropsia dos hamsters, realizada para colheita dos órgãos (baço, fígado e medula óssea) obteve-se os seguintes resultados: 100% dos animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram esplenomegalia, 50% dos hamsters destes dois grupos apresentaram hepatomegalia e 42% dos animais do grupo leishmaniose apresentaram ascite. Os hamsters do G_{T30} e G_{T45} não apresentaram sinais e sintomas durante o período de observação.

No presente trabalho após 120 dias os hamsters do grupo leishmaniose apresentaram hepatoesplenomegalia e ascite. Lei et al. (21) inocularam hamsters com *L. infantum chagasi* pela veia safena e em aproximadamente 15 semanas ($105 \pm 22,2$ dias), os animais apresentaram pele enrugada, aumento de volume abdominal devido à hepatoesplenomegalia, e/ou ascite. Freitas et al. (2) realizaram inoculação de sangue total de cão com leishmaniose e de concentrado de células mononucleares isoladas infectadas por *Leishmania* em hamsters e observaram que após inoculação de sangue total de cão com leishmaniose os sinais e sintomas clínicos nos hamster foram mais evidentes, apresentando aumentos variáveis no baço, no fígado e de gânglios linfáticos mesentéricos, bem como presença de líquido ascítico em alguns casos.

Dessa forma, pode-se dizer que no sangue canino da bolsa três utilizado para inoculação nos hamsters dos grupos G_L e G_{RB} , havia leishmanias e que essas foram transmitidas. O volume de sangue canino utilizado para inoculação dos hamsters no experimento (3,5mL) demonstrou que o parasita *Leishmania infantum chagasi* pode ser experimentalmente transmitido pelo sangue total de cães naturalmente infectados para seus os receptores (hamsters sensíveis).

Esse é um achado importante, dado ao amplo uso de transfusões de sangue na Medicina Veterinária. Além disso, no Brasil, geralmente a terapia pelo sangue envolve o uso de sangue total e de cães doadores escolhidos aleatoriamente, sem o diagnóstico laboratorial para leishmaniose.

Segundo Fast et al. (22), a ação da RB associada à luz UV resulta na inibição das citocinas/quimiocinas, por isso, hipotetizou-se que esse é o motivo, os hamsters do presente estudo receberam sangue tratado, não apresentaram sinais e sintomas clínicos, associado à baixa carga parasitária.

Segundo Goto e Lindoso (23), o hamster mimetiza a patogenia e a clínica da doença humana e canina, manifestando a hepatoesplenomegalia e supressão da resposta das células T. Portanto os animais dos grupos tratados G_{T30} e G_{T45} podem não ter desenvolvido a doença clínica pela supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, que segundo Rosypal et al. (24) interagem com os macrófagos parasitados. Estudos realizados por Guarga et al. (25) em cães sintomáticos provenientes da região do Mediterrâneo com LV revelaram que a ausência de resposta celular está relacionada com a diminuição dos níveis de CD4+ e altos títulos de anticorpos. Ainda de acordo com esses autores (24), os macrófagos infectados têm capacidade reduzida de interagir com linfócitos T, o que interfere na liberação de interferon-gama e promovem a destruição do parasito.

Dos sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose somente um foi negativo, não sendo encontradas formas amastigotas do agente em *imprinting* dos órgãos avaliados (medula óssea, baço e fígado), sendo, portanto 83% dos animais positivos para *Leishmania*. O mesmo ocorreu no grupo riboflavina. Porém dos sete animais do grupo tratado I e dos sete do grupo tratado II, quatro em cada grupo foram positivos na pesquisa de formas amastigotas de leishmanias (57%) em pelo menos um dos órgãos linfoides, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando se compara G_L e G_{RB} com os grupos tratados com riboflavina associada à luz ultravioleta (G_{T30} e G_{T45}).

Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV nos grupos G_{T30} e G_{T45} , em 57% dos animais em cada grupo detectaram-se as formas amastigotas no esfregaço sanguíneo, indicando que a técnica não eliminou completamente os parasitas.

Quando avaliados os órgãos linfoides separadamente, formas amastigotas de LV foram encontradas em *imprinting* da medula óssea dos hamsters no grupo leishmaniose, sendo que 86% das amostras eram positivas e 14% negativas; no grupo riboflavina 71% eram positivas e 29% negativas; no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 30 minutos (grupo tratado I) 29% eram positivas e 71% das lâminas eram negativas e no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 45 minutos (grupo tratado II) 14% eram positivas enquanto que em 86% das lâminas não foi encontrado o parasita. Essa menor porcentagem de lâminas positivas para *L. infantum chagasi* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando se compara os grupos tratados com luz UV por 30 e 45 minutos com os grupos leishmaniose e riboflavina.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram encontradas no *imprinting* de baço, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Sendo a porcentagem de amostras positivas 71% e a porcentagem de amostras negativas 29% no grupo leishmaniose e 57% positivas e 43% negativas, nos grupos riboflavina, tratado I e tratado II.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no *imprinting* de fígado, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$), sendo que 14% das amostras eram positivas e 86% negativas no G_L , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{RB} , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{T30} e 14% das amostras positivas e 86% negativas no G_{T45} .

A pesquisa de amastigotas foi positiva no baço na maioria dos animais infectados, independente do grupo inoculado com sangue de canino com leishmaniose, confirmando as observações de outros autores em infecções experimentais, e em casos caninos e humanos de leishmaniose visceral submetidos à necropsia (26,27,28). De acordo com Singh e Sivakumar (27), em cães, a sensibilidade é maior quando se utiliza aspirado esplênico. Segundo Zijlstra et al. (26) o diagnóstico da doença nos cães pode ser feito pela demonstração das formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula óssea e baço, com sensibilidade de 58, 70 e 96% respectivamente.

A pesquisa de formas amastigotas nos *imprintings* dos órgãos linfoides dos hamsters dos grupos G_L , G_{RB} , G_{T30} e G_{T45} serviu para diagnosticar a LV. Para Ferrer (29) uma das formas mais seguras de diagnóstico de leishmaniose visceral é a observação direta de formas amastigotas do parasita em *imprintings* de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos. Para Slappendel e Ferrer (30) a especificidade deste método é virtualmente 100%, mas dependendo do tempo despendido procurando o parasita a sensibilidade passa a ser de no máximo 80% em animais sintomáticos e menor em cães assintomáticos.

Os sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose tiveram todas as amostras de sangue negativas na PCR convencional, enquanto 100% das amostras de medula óssea e baço foram positivas. No fígado a PCR foi positiva em 42% das amostras. Isto ocorreu porque os animais não estavam mais em parasitemia, devido ao tempo transcorrido entre a inoculação e a obtenção do sangue (120 dias), estando os parasitas nos órgãos linfoides.

No grupo riboflavina 28% das amostras foram positivas pela PCR convencional no sangue, 71% no baço e no fígado e 86% foram positivas na medula óssea. Este grupo se comporta de forma semelhante ao G_L, já que a riboflavina utilizada sem a associação com a luz UV, não apresenta sua ação inativadora de agir como um fotossensibilizador, e desta forma segundo Marschner e Goodrich (9) não provoca os danos seletivos aos ácidos nucleicos esperados.

Dos hamsters que receberam sangue tratado com riboflavina e luz ultravioleta por 30 minutos (tratado 1), 28% das amostras foram positivas para PCR no sangue, 100% positivas no baço e medula óssea e 71% no fígado. Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV por 30 minutos os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, e quando realizada a técnica da PCR convencional, pode-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, indicando que o tratamento não eliminou completamente o parasita.

Os animais que receberam sangue tratado com riboflavina associada à luz UV por 45 minutos (tratado 2) apresentaram porcentagem de positivos na PCR convencional de 28% no sangue e 100% no baço, fígado e medula óssea. Mesmo após o tratamento com RB e 45 minutos de luz UV os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, podendo-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, pela PCR convencional, indicando que o tratamento assim como no grupo G_{T30} não eliminou completamente o agente.

Para o diagnóstico realizado por PCR convencional a utilização dos protocolos de luz UV (30 e 45 minutos) não revelou diagnóstico negativo, sendo necessário a utilização da PCR quantitativa para determinar a carga parasitária. Para Nunes et al. (31), a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação. De acordo com Miró et al. (32) e Paltrinieri et al. (33), nas amostras de sangue a sensibilidade é menor, principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea. Segundo Mortarino et al. (34) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas, baseando-se na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR, sendo um método mais sensível do que o PCR convencional, com menor risco de contaminação, uma vez que o sistema é fechado.

A somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado) foi de $134 \times 10^6 \pm 113 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo leishmaniose, $73 \times 10^6 \pm 43 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo riboflavina, $9 \times 10^6 \pm 19 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado I, com a associação de riboflavina mais 30 minutos de luz UV e de $0,5 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado II, com a associação de riboflavina mais 45 minutos de luz UV.

Isto demonstra que apesar dos hamsters serem positivos na técnica de PCR convencional para *L. infantum chagasi*, houve menor carga parasitária nos grupos tratados I e II, quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina ($p < 0,05$). Esta redução se deve, segundo Speek e Rosenkranz (10) ao fato da RB se associar aos ácidos nucleicos do parasita e interceder um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação destes ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina. Para Kumar et al. (11), a utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico, porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina.

O órgão com maior carga parasitária foi a medula óssea, todos os grupos apresentaram grande quantidade do parasita, porém houve significativamente menor carga parasitária na MO nos hamsters do grupo G_{T30} e G_{T45} quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina (RB) ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR da medula óssea nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

| Grupo | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Erro padrão |
|--------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------|-----------------------|------------------------|
| Leishmaniose | 133 x 10 ⁶ A | 112 x 10 ⁶ | 116 x 10 ⁶ | 6,62 | 304 x 10 ⁶ | 42 x 10 ⁶ |
| Riboflavina | 73 x 10 ⁶ A | 43 x 10 ⁶ | 86 x 10 ⁶ | 0,00 | 106 x 10 ⁶ | 19 x 10 ⁶ |
| Tratado I | 9 x 10 ⁶ B | 19 x 10 ⁶ | 3,87 | 0,00 | 52 x 10 ⁶ | 7 x 10 ⁶ |
| Tratado II | 0,45 x 10 ⁶ B | 1 x 10 ⁶ | 2,69 | 0,00 | 3 x 10 ⁶ | 0,45 x 10 ⁶ |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Quando se compara a redução da carga parasitária dos grupos com o grupo leishmaniose, o grupo riboflavina apresentou uma redução de 46% da carga inicial, enquanto o grupo tratado I (30 minutos de luz UV) teve uma redução de 93% da carga parasitária e o grupo tratado II (45 minutos de luz UV) uma redução de 99% da carga parasitária do início do experimento. Sendo o tratamento do GT₄₅ o mais efetivo na redução da carga parasitária.

O baço foi o segundo órgão com maior carga parasitária, havendo diferença significativa entre o grupo leishmaniose e o grupo riboflavina e tratado II ($p < 0,05$) (Tabela 2). Houve uma redução de 90% da carga parasitária no grupo riboflavina, de 40% no grupo tratado I (30 minutos de luz UV) e de 87% no grupo tratado II (45 minutos de luz UV), quando comparados ao grupo leishmaniose.

Tabela 2. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do baço nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

| Grupo | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Erro padrão |
|--------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------|-----------------------|-----------------------|
| Leishmaniose | 476 x 10 ³ A | 1 x 10 ⁶ | 90,87 | 9,39 | 2 x 10 ⁶ | 475 x 10 ³ |
| Riboflavina | 45 x 10 ³ B | 87 x 10 ³ | 5 x 10 ³ | 64,70 | 239 x 10 ³ | 33 x 10 ³ |
| Tratado I | 283 x 10 ³ A | 404 x 10 ³ | 2 x 10 ³ | 300,55 | 911 x 10 ³ | 152 x 10 ³ |
| Tratado II | 59 x 10 ³ B | 99 x 10 ³ | 9 x 10 ³ | 0,00 | 276 x 10 ³ | 37 x 10 ³ |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

O fígado não apresentou carga parasitária tão alta quanto aos demais órgãos avaliados, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Tabela 3). Segundo Wilson et al. (35) o fígado serve como local de replicação inicial do parasito e o baço como local de persistência. Em seu estudo com camundongos, 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar maior carga parasitária em comparação ao fígado, sugerindo que o fígado esteja montando uma resposta imune eficiente frente ao parasito. Sabe-se que a infecção do fígado é auto limitante, com formação de granulomas, e que no baço o crescimento do parasito é lento e persistente, além desse órgão ser conhecido por ser mais suscetível à infecção por *Leishmania* spp.

Tabela 3. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do fígado nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

| Grupo | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Erro padrão |
|--------------|--------|---------------|---------|--------|--------|-------------|
| Leishmaniose | 58,22 | 131,86 | 7,59 | 0,00 | 356,78 | 49,84 |
| Riboflavina | 111,16 | 218,35 | 11,22 | 0,00 | 500,61 | 97,65 |
| Tratado I | 83,50 | 220,00 | 18,21 | 2,16 | 583,20 | 83,30 |
| Tratado II | 119,50 | 207,17 | 18,93 | 0,00 | 551,70 | 78,30 |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

O sangue em todos os grupos teve baixa carga parasitária pela técnica de qPCR, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 4). Uma explicação para este fato é que parasitemia nesta fase da infecção é menor, já que os parasitas encontram-se nos órgãos linfoides. Na PCR para amostras de sangue, a sensibilidade é menor (31), principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele, medula óssea (32,33) e baço (36).

Tabela 4. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do sangue nos diferentes grupos : leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

| Grupo | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Erro padrão |
|--------------|-------|---------------|---------|--------|--------|-------------|
| Leishmaniose | 0,85 | 1,35 | 0,25 | 0,00 | 3,24 | 0,61 |
| Riboflavina | 0,03 | 0,08 | 0,00 | 0,00 | 0,20 | 0,03 |
| Tratado I | 0,30 | 0,81 | 0,00 | 0,00 | 2,13 | 0,30 |
| Tratado II | 0,46 | 0,88 | 0,00 | 0,00 | 2,42 | 0,33 |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A diferença nos resultados no sangue e nos órgãos linfoides pode estar relacionada com a distribuição heterogênea dos parasitas, em cada tecido, bem como a carga parasitária e resposta imune local (37).

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos de Cardo et al. (8), que utilizando riboflavina e luz UV em bolsas de plasma, obtiveram uma redução significativa de *Leishmania donovani infantum*, principalmente quando se avaliam os resultados das cargas parasitárias na medula óssea e no baço.

A associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária de *Leishmania infantum chagasi* quando se considera a somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado), porém, não evitou que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de terapia pelo sangue, já que o parasita e o seu DNA foram encontrados nos órgãos linfoides. Porém, o sangue parasitado tratado com riboflavina e luz ultravioleta não foi capaz de produzir sinais e sintomas em hamsters durante o período estudado de 120 dias.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, permitem concluir que o sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento de 21 dias.

O tratamento com luz ultravioleta e riboflavina do sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* impede o aparecimento de sintomas nos hamsters e diminui a sua carga parasitária.

O trabalho está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº 120/2007 – CEEA.

REFERÊNCIAS

1. Owens SD, Oakley DA, Marrayott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J Am Vet Med Assoc. 2001;219:1076-83.
2. Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors. Vet Parasitol. 2005;137:159-67.
3. Bryant BJ, Klein HG. Pathogen inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. Arch Pathol Lab Med. 2007;131:719-33.
4. Wendel S. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:275-81.
5. Goodrich RP, Hansen E, Gilmour D, Jesser R, Keil S, Goodrich T. Inactivation of pathogens in blood products with riboflavin and light. Lakewood, CO: Gambro BCT Inc; 2000.
6. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. Transfus Med Rev. 2008;22:133-53.
7. Reikvam H, Marschner S, Apelseth TO, Goodrich R, Hervig T. The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. Blood Transfus. 2010;8:186-92.
8. Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. Vox Sang. 2006;90:85-91.
9. Marschner S, Goodrich R. Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light. Transfus Med Hemother. 2011;38:8-18.
10. Speck WT, Rosenkranz HS. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia a potential environmental health hazard to new-born infants: a review. Environ Mutagen. 1979;1:321-36.
11. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. J Photochem Photobiol. 2004;80:15-21.

12. Goodrich RP, Edrich RA, Goodrich L, Scott C, Manica K, Hlavinka D, et al. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: Silva E, Edwards AM. Flavins: photochemistry and photobiology. Comprehensive series in photochemical and photobiological sciences. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2006. p.83-113.
13. Janetzko K, Hinz K, Marschner S, Klüter H, Bugert P. Monitoring of the mirasol pathogen reduction procedure for platelet concentrates by PCR and bioanalyzer. *Transfus Med Hemother*. 2007;34:60-5.
14. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SDK, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 2004;44:877-85.
15. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apheresis Sci*. 2007;37:131-7.
16. Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 2007;47:240-7.
17. Goodrich RP, Doane S, Reddy HL. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. *Biologicals*. 2010;38:20-30.
18. Seltsam A, Müller TH. UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. *Transfus Med Hemother*. 2011;38:43-54.
19. Hochman B, Ferreira LM, Bôas FCV, Mariano M. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Cir Bras*. 2003;18:415-30.
20. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998.
21. Lei SM, Ramer-Tait AE, Dahlin-Laborde RR, Mullin K, Beetham JK. Reduced hamster usage and stress in propagating *Leishmania chagasi* promastigotes using cryopreservation and saphenous vein inoculation. *J Parasitol*. 2010;96:103-8.
22. Fast LD, Dileone G, Marschne S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion*. 2006;51:1397-404.
23. Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:615-23.
24. Rosypal AC, Gogal RMJ, Zajac AM, Troy GC, Lindsay DS. Flow cytometric analyses of cellular responses in dogs experimentally infected with a north american isolate of *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2005;131:45-51.

25. Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, et al. Canine leishmaniasis transmission, higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T-helper cells. *Res Vet Sci.* 2000;69:249-53.
26. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EAG, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop Med Int Health.* 2001;6:108-13.
27. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003;49:55-60.
28. Wyllie S, Fairlamb AH. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. *Acta Trop.* 2006;97:364-9.
29. Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Canine Leishmaniasis: an update; 1999; Barcelona. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet; 1999. p.6-10.
30. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE. Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p.450-8.
31. Nunes CM, Dias AKK, Gottardi FP, Paula HB, Azevedo MAA, Lima VMF, et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2007;16:5-9.
32. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008;24:371-7.
33. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Ass.* 2010;236:1184-91.
34. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia.* 2004;46:163-7.
35. Wilson ME, Sandor M, Blum AM, Young BM, Metwali A, Elliott D, et al. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol.* 1996;156:2231-22.
36. Solcà MS, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, Santos WL, Fraga DH, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2012;184:133-40.
37. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179:142-4.

Recebido em: 28/05/2015

Aceito em: 11/07/2016

PREVALÊNCIA E IMPACTO ECONÔMICO DO PRODUTOR DECORRENTE DA RETENÇÃO DE PLACENTA EM REBANHOS LEITEIROS DA AGRICULTURA FAMILIAR, DO SUDOESTE PARANAENSE

Fabricio Bernardi¹
Marina Gabriela Possa¹
Adalgiza Pinto Neto²
Claudemir Weber³
Guilherme Oberlender⁴

RESUMO

A retenção de placenta é uma síndrome multifatorial caracterizada pela permanência de parte ou totalidade das membranas fetais no lúmen uterino de 12 a 24 horas após o parto. Neste estudo, avaliou-se a prevalência, o conhecimento dos produtores e o impacto econômico direto decorrente da retenção de placenta em vacas leiteiras oriundas de rebanho da agricultura familiar no Sudoeste Paranaense. Foram observados 607 partos, durante um ano, em 25 propriedades leiteiras de agricultura familiar localizadas em quatro municípios da Região estudada. Considerou-se para o diagnóstico, a placenta retida após 12 horas do parto. Foi aplicado um questionário semiestruturado ao produtor de leite em todas as propriedades que registraram retenção de placenta contendo informações sobre o conhecimento do produtor, prevalência, época de ocorrência, vaca e tratamento instituído, avaliando-se os prejuízos diretos. Os resultados revelaram que 14,66% das vacas tiveram retenção de placenta, 100% dos produtores de leite souberam o que é retenção de placenta, que a enfermidade resulta em prejuízos e solicitaram atendimento veterinário. Os produtores consideraram placenta retida de 12 à 72 horas após o parto, refletindo na demora para o atendimento veterinário. 36% dos produtores consideraram fatores de risco apenas aqueles ligados ao manejo, 12% a enfermidades, 28% ao manejo e a enfermidades, 4% a enfermidades e fatores ligados aos animais e 8% consideraram ao manejo, a enfermidades e aos animais. A prevalência média de retenção de placenta variou entre as propriedades de 2,9 a 50%, sendo registrados casos nos quatro municípios de estudo. A época de maior prevalência foi a época fria, acometendo 78% dos animais da Raça Holandesa, sendo 37,3% das vacas com 1-4 anos, 49,4% com 4-7 e 13,5% acima de 7 anos. 57,3% das vacas se encontravam na 2ª a 4ª crias, 21,3% na 1ª e 21,3% com cinco ou mais crias. O tratamento instituído variou entre os animais (antibiótico, antiinflamatório e prostaglandina F2 α). A perda econômica média foi R\$ 242,19 (\pm 85,98) por animal acometido. Observa-se assim, uma expressiva prevalência de retenção de placenta nos rebanhos estudados, possivelmente decorrente da multiplicidade dos fatores predisponentes.

Palavras-chave: bovinos, prejuízos, prevalência, retenção de placenta.

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS; Campus Realeza; Medicina Veterinária; Paraná; Brasil.

² Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS; Campus Realeza; Medicina Veterinária – Reprodução Animal; Paraná; Brasil. Endereço para correspondência: adalgiza.uffs@gmail.com

³ Médico Veterinário Autônomo; Nova Prata do Iguaçu; Paraná; Brasil

⁴ Instituto Federal do Sul de Minas - IFSULDEMINAS; Campus Muzambinho; Medicina Veterinária; Minas Gerais; Brasil.

PREVALENCE AND ECONOMIC IMPACT OF PRODUCER ARISING OUT OF RESTRAINT IN SHEEP PLACENTA DAIRY OF FAMILY FARM, SOUTHWEST PARANAENSE

ABSTRACT

The retained placenta is a multifactorial syndrome characterized by continuing all or part of the fetal membranes and the uterine lumen 12 to 24 hours after birth. In this study, we evaluated the prevalence, awareness of producers and the direct economic impact of the retained placenta in dairy cows herd originated from the family farm in Southwest Paranaense. 607 births were observed for one year on 25 dairy farms of family farms, located in four municipalities of the studied region. It was considered for diagnosis, retained placenta after 12 hours of birth. A semi-structured questionnaire to the milk producer in all properties that recorded retained placenta was used, containing information about the producer of knowledge, prevalence, time of occurrence, cow, and treatment, evaluating up the direct losses. The results showed that 14.66% of the cows had retained placenta, 100% of dairy farmers know what is retained placenta, the disease results in damage and requested veterinary care. The producers considered placenta retained 12 to 72 hours after delivery, reflecting the delay for veterinary care. 36% of producers considered risk factors, only those related to management, 12% to diseases, 28% to management and to disease, 4% to diseases and factors related to animals and 8% consider the handling, diseases and animals. The average prevalence of retained placenta ranged between properties from 2.9 to 50%, with reported cases in the four municipalities of study. The time of highest prevalence was the cold season, affecting 78% of the animals, with 37.3% of cows with 1-4 years, 49.4% with 4-7 and 13.5% over 7 years. 57.3% of the cows were in the 2nd to 4th offspring, 21.3% and 21.3% in the 1st five or more offspring. The treatment varied between animals (antibiotic, anti-inflammatory and F2 α prostaglandin). The average economic loss was R \$ 242.19 (\pm 85.98) per affected animal. It is observed thus a significant prevalence of retained placenta in the herds, possibly due to the multiplicity of predisposing factors.

Keywords: cattle, losses, prevalence, retained placenta.

PREVALENCIA E IMPACTO ECONÓMICO DEL PRODUCTOR DERIVADOS DE RETENCIÓN PLACENTA EN REBAÑO LECHERO DE AGRICULTURA FAMILIAR, SUROESTE PARANAENSE

RESUMEN

La placenta retenida es un síndrome multifactorial caracterizado por continuar la totalidad o parte de las membranas fetales y el lumen uterino de 12 a 24 horas después del parto. En este estudio se evaluó la prevalencia, los conocimientos de los productores y el impacto económico directo de la retención de la placenta en vacas lecheras de agricultura familiar en el suroeste Paranaense. Se observaron 607 nacimientos durante un año en 25 explotaciones lecheras familiares, ubicados en cuatro municipios de la región estudiada. Considerado para el diagnóstico, retención de placenta después de 12 horas de su nacimiento. Se utilizó un cuestionario semi-estructurado para el productor de leche de todas las propiedades que registraron placenta retenida, que contiene información sobre el productor de conocimiento, la prevalencia, el tiempo de ocurrencia, vaca, y el tratamiento, la evaluación de las pérdidas directas. Los resultados mostraron que el 14,66% de las vacas había retención de placenta, el 100% de los productores de leche saben lo que es retención de placenta, los resultados de la enfermedad en daños y piden atención veterinaria. Los productores consideran placenta

retenida 12 a 72 horas después del parto, lo que refleja el retraso para los cuidados veterinarios. 36% de los productores considerados factores de riesgo, sólo los relacionados con la gestión, el 12% de las enfermedades, el 28% a la gestión y la enfermedad, el 4% de las enfermedades y los factores relacionados con los animales y el 8% considera la manipulación, las enfermedades y los animales. La prevalencia media de la placenta retenida osciló entre propiedades 2,9-50%, con casos reportados en los cuatro municipios de estudio. El momento de mayor prevalencia fue la temporada de frío, que afecta a 78% de los animales de Holstein, con el 37,3% de las vacas con 1-4 años, el 49,4% con 4-7 y un 13,5% más de 7 años. 57,3% de las vacas estaban en el 2 al 4 crías, 21,3% y 21,3% en el primero de cinco o más crías. El tratamiento varió entre los animales (antibiótico, anti-inflamatorio y prostaglandina F2a). La pérdida económica promedio fue de R\$ 242,19 (\pm 85,98) por animal afectado. Se observa así una prevalencia significativa de la placenta retenida en los rebaños, posiblemente debido a la multiplicidad de factores predisponentes.

Palabras clave: ganado, pérdidas, la prevalencia, la placenta retenida.

INTRODUÇÃO

No Brasil a bovinocultura de leite é caracterizada por um grande número de animais com baixos índices produtivos (1). O Estado do Paraná possui um rebanho leiteiro aproximado de três milhões de cabeças, necessitando de melhorias no manejo produtivo e reprodutivo para se firmar no cenário nacional, aliado a minimização dos impactos ambientais e redução nos custos de produção (2), visto que atualmente a média de produção no estado está em 10,9 litros/vaca/dia e no Sudoeste Paranaense encontra-se em 9,4 litros/vaca/dia (1). Entre os fatores que influenciam no sucesso econômico da atividade estão os problemas em relação à eficiência reprodutiva e a ocorrência de doenças no período de transição (3).

Por ser um período crítico para a saúde do animal, aproximadamente 75% das doenças em vacas leiteiras acontecem na primeira semana após o parto (4,5). O aumento da exigência nutricional para a produção de leite, aliada à baixa ingestão de matéria seca, leva a vaca a um quadro de balanço energético negativo (BEN) que contribui para alta incidência de desordens metabólicas, e outras afecções, como mastite, hipocalcemia, metrite, cetose, deslocamento de abomaso e retenção de placenta (6,7).

A retenção de placenta é uma das complicações do período pós-parto que ocorre com maior frequência em bovinos que outras espécies, com predomínio em vacas leiteiras (8-10), sendo considerada condição patológica quando parte ou a totalidade das membranas fetais permanece no lúmen uterino (8,11). Os bovinos possuem placenta cotiledonária, constituída de carúnculas maternas e cotilédones fetais que formam de 70-120 placentomas, onde as membranas fetais ficam fortemente aderidas pela justaposição das vilosidades coriônicas ao útero durante a gestação, para que cumpram sua função de trocas metabólicas entre a mãe e feto (12). Elas devem ser liberadas na terceira etapa do parto com expulsão espontânea, decorrente da perda da aderência feto-maternal, favorecida pela contração uterina (13).

O atraso no processo de liberação da placenta é visto de forma diferente quanto ao tempo após o parto que a placenta demora a ser expelida fisiologicamente, variando de três a 24 horas (9,11,14-17). A incidência média da retenção de placenta varia de 2 a 55% das partições (11,16,18), sendo comumente descrita em torno de 7 a 9% (11,16).

O mecanismo de retenção da placenta é de caráter multifatorial, envolvendo fatores fisiológicos, patológicos, ambientais e nutricionais (9,16). Fatores predisponentes são: ordem de parto, estresse, dor, partos distócicos, gemelares, hipocalcemia, abortos na fase final, natimortos, alterações na duração da gestação, cesariana, fetotomias, inércia uterina, fatores nutricionais, hereditários, mecânicos, infecciosos, relacionados ao manejo, histológicos e

hormonais, idade, estação do ano e principalmente falhas na separação das membranas materno-fetal (3,8,10,11,16,18-21).

A retenção de placenta é um problema constante nas propriedades produtoras de leite, podendo acarretar queda na produção de leite, redução na fertilidade e eficiência reprodutiva, predisposição a outras enfermidades, além dos altos custos com tratamento e descarte, ou até a morte de animais (8,9,11,16,18,22). Observou-se que até o momento não há dados elucidando a prevalência e os fatores de risco para esta enfermidade na Região Sudoeste do Estado do Paraná, sendo que a identificação destes fatores permite estabelecer medidas profiláticas mais efetivas, reduzindo assim sua ocorrência e consequentemente os prejuízos para estes produtores de leite da agricultura familiar que têm na atividade leiteira uma importante fonte de renda.

Esse estudo objetivou avaliar a prevalência e o impacto econômico direto decorrente da retenção de placenta de vacas leiteiras oriundas de rebanhos da agricultura familiar, da Região Sudoeste do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em propriedades de leite de agricultura familiar com rebanhos de pequeno a médio porte em sistema de manejo semi-intensivo, localizadas nos municípios de Nova Prata do Iguaçu, Nova Esperança do Sudoeste, Realeza e Salto do Lontra, situados na Região Sudoeste do Estado do Paraná, durante o período de julho de 2013 a julho de 2014. A região é caracterizada por ser de clima subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes, sem estação seca e com poucas geadas na estação fria (23). A altitude média é de 515 metros (438 à 538 metros), latitude sul (25° 37' 57" a 25° 54' 26") e longitude oeste (53° 15' 45" à 53° 31' 57"), e a média das temperaturas do mês mais quente é superior a 22°C, e a do mês mais frio é inferior a 18°C (23).

Estudaram-se os partos de vacas leiteiras de diferentes raças, pelo acompanhamento e registro daqueles que apresentaram retenção de placenta, considerando para o diagnóstico a presença parcial ou total dos anexos fetais no útero da vaca acima de 12 horas após o parto.

Inicialmente, foram contatados os produtores de leite e Médicos Veterinários da Região, para notificarem os casos de retenção de placenta. A partir daí, aplicou-se um questionário semiestruturado ao produtor, contendo dados do animal, rebanho, conhecimento do produtor sobre a retenção de placenta e tratamento instituído.

Ao avaliar o conhecimento do produtor as informações coletadas foram: se o produtor sabe o que é retenção de placenta, se sabe que traz prejuízos à atividade leiteira, quantas horas após o parto considera a placenta retida, se solicita atendimento veterinário e quais fatores de risco seriam causadores da enfermidade (relacionados ao manejo: falhas na dieta, estresse, ambiente, época do ano e manejo dos animais; as enfermidades: abortos, doenças infecciosas, hipocalcemia e parto complicado, e aos animais: idade da vaca, tempo de gestação, número de bezerros, inerentes ao bezerro e hereditário). Os dados coletados sobre o animal e rebanho foram: raça, idade e a ordem de parto.

Para se estimar os custos diretos decorrentes da retenção de placenta foram coletadas informações sobre o custo com a consulta veterinária, medicamentos e volume de leite descartado, quando necessário. A partir desses dados, somou-se os custos da consulta veterinária e medicamentos, ao descarte do leite decorrente do tratamento com antibióticos (número de dias tratamento x produção diária x preço do leite), levando-se em conta o preço médio do litro de leite no mês da ocorrência, no Estado do Paraná, de acordo com CEPEA (24).

Os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva, a fim de estabelecer a prevalência e o impacto econômico da retenção de placenta nos rebanhos de agricultura familiar, nos municípios estudados. Os valores médios foram testados pelo

programa estatístico IBM SPSS 20.0® (25) por meio de análise descritiva de frequência, considerando 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudou-se 607 vacas paridas em 25 propriedades que apresentaram média de $24,28 \pm 16,33$ partos/propriedade, sendo que destes 14,66% (89/607) das vacas apresentaram retenção de placenta, com média de $3,56 \pm 2,95$ casos por propriedade.

Sobre o conhecimento do produtor relativo a retenção de placenta, verificou-se que 100% (25/25) deles sabiam o que é retenção de placenta, bem como os prejuízos oriundos dessa enfermidade à atividade. De forma semelhante, observou-se que todos os produtores solicitaram atendimento veterinário nos casos de ocorrência da retenção de placenta nos animais de suas propriedades. Porém, faltam estudos descritos na literatura envolvendo o conhecimento do produtor de leite, especialmente aqueles ligados à agricultura familiar.

O diagnóstico da retenção de placenta, nos animais estudados foi de 12 horas após o parto. O tempo do parto até o diagnóstico de retenção apresenta variação entre os autores, sendo que Pimentel (14) considera retida a placenta que não for expulsa até oito horas após o parto, enquanto outros autores consideram 12 horas após o parto (9,11,15,26-29) e 24 horas após o parto (16,17,19,30-33). Já os produtores de leite, 44% (11/25) consideram a placenta retida após 24 horas do parto, 24% (6/25) após 12 horas, 16% (4/25) após 72 horas, 12% (3/24) após 48 horas e 4% (1/25) após 36 horas do parto.

A variação considerada no diagnóstico entre os produtores possivelmente refletiu no tempo transcorrido do parto ao atendimento veterinário, onde 18% (16/89) dos animais tiveram o atendimento veterinário de 12 a 24 horas após o parto; 61,8% (55/89) de 25 a 48 horas e 20,2% (18/89) tiveram o atendimento veterinário acima de 48 horas após o parto. Borges (34) relatou que 44% dos proprietários solicitaram intervenção nas primeiras 24-48 horas, enquanto que 66% deles solicitaram atendimento após 48 horas, quando foi observado aparecimento de sinais secundários e complicações decorrentes da retenção de placenta.

A demora no atendimento dos animais com retenção de placenta favorece a ocorrência de complicações como atraso na involução uterina e no reinício da atividade ovariana pós-parto, além de infecção uterina (27), uma vez que a permanência da placenta no útero favorece a ocorrência de infecções ascendentes, causadas por agentes etiológicos oportunistas presentes no meio ambiente, devido à grande quantidade de matéria orgânica acumulada no útero e outros líquidos que servem como substrato para as bactérias (26,33,34). Porém, neste estudo somente 3,37% (3/89) das vacas apresentaram manifestação clínica de infecção uterina no momento do atendimento veterinário, não sendo avaliada a ocorrência desta enfermidade posteriormente.

Segundo Laven e Peters (30), o desenvolvimento de metrite pode ser até 19 vezes superior em vacas que tiveram retenção de placenta, sendo a principal causa de comprometimento da eficiência reprodutiva das vacas. LeBlanc (35) destacou que normalmente 25-50% das vacas com retenção de placenta irão desenvolver metrite. Além disto, as consequências da retenção de placenta são aumento no período de serviço, redução na taxa de gestação, atraso no primeiro serviço, aumento do número de serviços por concepção e conseqüentemente, maior intervalo de partos (29,32). Para Fernandes (26) a redução na taxa de gestação se deve a impossibilidade de estabelecimento ou manutenção de uma nova gestação, pela morte dos gametas ou embriões.

Verificou-se que 36% (9/25) dos produtores consideram como fatores de risco para a retenção de placenta apenas aqueles ligados ao manejo (falhas na dieta, estresse, ambiente, época do ano e manejo), 18% (7/25) ao manejo e enfermidades, 12% (3/25) a enfermidades (abortos, doenças infecciosas, hipocalcemia e parto complicado), 8% (2/25) ao manejo,

enfermidades, fatores ligados aos animais (idade da vaca, tempo de gestação, número de bezerros, fatores ligados ao bezerro e hereditário) e 4% (1/25) a enfermidades e aos animais.

Estes dados refletem a falta de conhecimento dos produtores sobre a multiplicidade dos fatores de risco para a retenção de placenta (9,16), o que pode muitas vezes implicar em falhas no manejo realizado com estes animais ou no descuido com a prevenção de doenças reprodutivas, além dos acasalamentos inadequados que podem levar a partos distócicos e predispor a ocorrência da enfermidade (8).

A falta de conhecimento do produtor sobre a retenção de placenta pode implicar no comprometimento da higiene e negligência no preparo das maternidades, favorecendo a ocorrência de afecções genitais no período pré-parto, e consequente atraso na liberação das membranas fetais (8). Ao mesmo tempo, descuidos com o ambiente, seja pela proximidade de outros animais ou pela falta de conforto térmico, provoca estresse na fêmea, que juntamente com a dor, estimulam a liberação de catecolaminas que promovem a redução da motilidade uterina, com relaxamento do útero e consequente diminuição na capacidade de evacuação do conteúdo uterino (16).

A prevalência de retenção de placenta foi de 14,66%, com variação entre os rebanhos (16,80% \pm 10,63), de 2,9 a 50%, sendo que em somente 12% (3/25) deles apresentaram prevalência inferior a 7% (Figura 1).

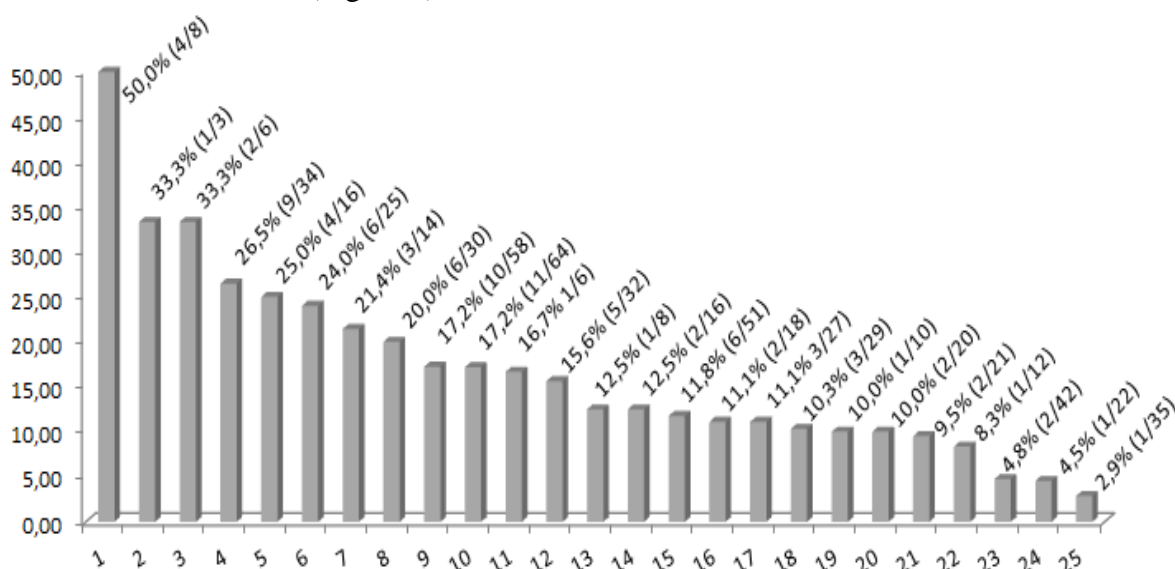


Figura 1. Prevalência de retenção de placenta em vacas leiteiras nos diferentes rebanhos da agricultura familiar, do Sudoeste Paranaense.

A prevalência média observada no estudo é considerada alta quando comparada a outros estudos desenvolvidos no exterior (16,29,30,32,36) e no Brasil (17,27,37,38). Nos estudos realizados no exterior, observou-se na Nova Zelândia relato de 2,0% de prevalência de retenção de placenta, 3,8% na Grã-Bretanha, 4,1% na Irlanda (30), 4,7% na Alemanha (36), 6,3% na Arábia Saudita (30), 6,9% no Irã (28), 7,7% nos Estados Unidos, 7,7% na Suécia, 8,4% Israel, 8,9% na Índia (30) e 12,1% na Tailândia (29). No Brasil, estudos semelhantes revelaram 11,2% no Rio Grande do Sul (37) e em Minas Gerais 12,8% (17), 12,9% (38), 13,75% (27) e 15,7% (39).

Horta (8) relata variação de 3-12% de prevalência de retenção de placenta, que pode chegar a 61% em condições anormais de parto, alimentação e ocorrência de doenças reprodutivas. Nobre et al. (17) relataram que a ocorrência de retenção de placenta varia anualmente, estando diretamente relacionada aos fatores de risco predisponentes, o momento considerado no diagnóstico e o sistema de produção.

Quanto à distribuição geográfica, foram registrados casos nos quatro municípios estudados sendo 6,7% (6/89 - uma propriedade) em Nova Esperança do Sudoeste; 22,5% (20/89 - três propriedades) em Realeza; 25,8% (23/89 - oito propriedades) em Nova Prata do Iguaçu e 44,9% (40/89 - 13 propriedades) em Salto do Lontra.

Ao observar a prevalência da retenção de placenta nas diferentes épocas do ano verificou-se que 64,05% (57/89) dos casos ocorreram na época do ano com temperaturas amenas (maio a outubro) e 35,95% (32/89) dos casos em épocas de temperaturas mais elevadas (novembro a abril), considerando a distribuição uniforme dos partos ao longo do ano, de acordo com os produtores. Condições climáticas desfavoráveis podem levar os animais a condições de estresse, com aumento do cortisol circulante por longos períodos, promovendo imunossupressão, e consequentemente retenção de placenta (38).

Resultados semelhantes foram descritos por Lima e Domingues (21) ao relatarem maior ocorrência de retenção de placenta durante os meses frios, por Secco (10) que destacou a variação sazonal na prevalência de retenção de placenta, sendo de 11,6% na época fria e 2,6% na época quente e, Fernandes et al. (38) ao relatarem 8,8% (45/77) de retenção de placenta em época quente e 19,4% (32/77) em época fria. No entanto, Laven e Peters (30), Borges (34), Fernandes et al. (39), Nobre et al. (17) e Binabaj et al. (28) destacaram a ocorrência de taxas superiores de retenção de placenta em temperaturas elevadas devido ao estresse térmico e nutricional. Já Rezende et al. (27) não detectaram interação entre a incidência com a época do ano.

É possível que a prevalência de 64,05% (57/89) de retenção de placenta ocorrida em meses frios do ano, como observado nesse estudo, se relacione a possíveis deficiências nutricionais decorrentes da menor oferta de pastagens perenes, e consequentemente menor consumo de alimentos pelos animais, como é típico na época fria da Região Sul do País, onde se desenvolveu esse estudo. Deficiência nutricional levaria a imunossupressão, falha na eliminação da placenta, aumentando a suscetibilidade dos animais a essa e outras doenças (8,16,17,32,34,38).

Dos animais acometidos por retenção de placenta 78,7% (70/89) eram da Raça Holandesa, 10,1% (9/89) mestiços Jersolanda, 4,5% (4/89) da Raça Jersey; 4,5% (4/89) mestiços Girolanda e 2,2% (2/89) Pardo-Suíço. O número de casos ocorridos em animais da Raça Holandesa reflete a predominância desta raça nos rebanhos das propriedades estudadas, relatada em 52% (13/25) das propriedades como raça predominante, e 36% (9/89) como segunda raça mais importante para composição dos rebanhos.

Dos animais acometidos 37,3% (33/89) das vacas apresentaram idade entre um e quatro anos; 49,4% (44/89) de quatro a sete anos e 13,5% (12/89) acima de sete anos de idade. Borges (34) relatou prevalência predominante de retenção de placenta em animais até sete anos, Pelegrino et al. (22) relataram que 72% dos casos ocorrem em fêmeas de cinco a sete anos de idade, e Nobre et al. (17) relataram aumento da ocorrência com a idade do animal.

Ao analisar a ordem de partos verificou-se que a maioria (57,3%; 51/89) dos animais acometidos se encontrava na segunda até a quarta crias, 21,3% (19/89) de primeira cria e 21,3% (19/89) com cinco ou mais crias. Resultados semelhantes foram relatados por Borges (34), sendo 52% de retenção de placenta em animais na segunda até a quarta crias, 15% nos animais de primeira cria e 33% naqueles com cinco ou mais crias. Pelegrino et al. (22), descreveram que a maioria dos autores relata 3,5% de incidência de retenção de placenta em vacas primíparas e 24,4% no nono parto.

Autores citam aumento dos riscos de retenção de placenta a medida que aumenta a ordem de lactação (16,28), possivelmente relacionados ao fato das múltiparas apresentarem sistema imune menos efetivo, para responder aos desafios do desgaste sofrido nos partos anteriores (17,27). Ainda, Borges (34) cita possível falha progressiva da contratilidade do miométrio em animais a partir da quarta lactação, levando ao aumento expressivo no número de casos a partir do oitavo parto. Rezende et al. (27) relataram ainda que a ordem de lactação

não interferiu na retenção de placenta, mas sim no intervalo do parto à concepção, que aumentou a partir da terceira cria. No entanto, dos animais estudados, acometidos por retenção de placenta, 21,3% (19/89) apresentaram cinco ou mais lactações, enquanto que 78,65% (70/89) menos que quatro lactações.

Dos tratamentos instituídos, observou-se que 66,3% (59/89) dos animais receberam antibiótico sistêmico, antiinflamatório e prostaglandina; 16,9% (15/89) antibiótico intrauterino, antibiótico sistêmico, antiinflamatório e prostaglandina; 10,1% (9/89) antibiótico sistêmico e prostaglandina e 6,7% (6/89) somente prostaglandina. Associada ao tratamento, em todos os casos foi realizada a remoção manual da placenta, quando descolada, ou então, o corte da mesma próximo à rima vulvar.

A variação nos tratamentos utilizados reflete a ampla gama de tratamentos descritos na literatura (8,10,14,16,19,22,35,40,41). A terapia na retenção de placenta visa resolver a doença clínica, melhorando o bem estar do animal, reduzindo riscos de morte e perdas produtivas, reestabelecendo a saúde dos órgãos reprodutivos para que ocorra a concepção dentro do período desejado (16). Horta (8) relata vários tipos de tratamento que podem ser utilizados com eficácia variada, desde a ausência de qualquer intervenção, remoção manual, uso de ocitocina, prostaglandinas e collagenases.

O uso de prostaglandina, observado em todos os tratamentos instituídos nos animais desse estudo, é de uso controverso pela pouca indicação de que acelere o processo de expulsão da placenta, reduz o risco de infecções e/ou melhora a eficiência reprodutiva das vacas (16). No entanto, a utilização da prostaglandina ou seus análogos, associada ou não ao uso de antibióticos, poderia acelerar a involução uterina e reduzir a incidência de infecções uterinas, melhorando o desempenho reprodutivo destas vacas, tendo um efeito pronunciado quando na associação com antibióticos (39).

Santos (16) recomenda o monitoramento das vacas com retenção de placenta, a fim de realizar tratamento baseado em antimicrobianos sistêmicos, ou intrauterinos somente quando as fêmeas apresentarem sinais sistêmicos como febre e inapetência. Não há nenhuma vantagem de administrar antibióticos em todos os casos (35). No entanto, nesse estudo 91,01% (81/89) dos animais com retenção de placenta foram tratados com antibióticos sem correlação com sinais sistêmicos em todos os casos, uma vez que a maioria (55,1%) dos animais não apresentou hipertermia e/ou redução de apetite.

Pimentel (14) recomenda uso exclusivo de antimicrobianos sistêmicos e antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), associados ao uso de PGF₂α, que estimula as contrações endometriais, na expulsão do conteúdo uterino e aumenta a capacidade fagocítica dos neutrófilos. No entanto, deve-se ter cuidado com a imediata administração de AINEs após o parto, devido ao bloqueio da síntese de prostaglandina endógena, que possui papel imprescindível no processo fisiológico de separação/expulsão da placenta (10,19,22). Mesmo assim, foram utilizados antiinflamatórios em 83,15% (74/89) dos animais com retenção de placenta.

A remoção manual da placenta não é recomendada pela ausência de benefícios à vaca e, quando mal executada pode ser deletéria, principalmente quando há metrite séptica, ou tóxica em que o útero fica mais friável e sujeito a danos (16,40). No entanto, a placenta pode ser delicadamente removida quando estiver solta no interior da cavidade uterina, após a realização de exame higiênico vaginal (8,40), coincidindo com as práticas realizadas nesse estudo.

A retenção de placenta implica em custos diretos (medicamentos, mão-de-obra e descarte de leite), e indiretos (ocorrência de outras doenças, maior intervalo de partos, maior número de serviços, diminuição na produção de leite, infertilidade, descarte e/ou morte do animal (18,30). Nesse estudo, observou-se que a utilização de medicamentos para o tratamento da retenção de placenta, levou ao descarte do leite em 86,5% (77/89) dos animais

acometidos. Os custos diretos decorrentes da retenção de placenta nos animais estudados encontram-se descritos na Tabela 1.

Observou-se neste estudo, que o custo com atendimento veterinário, medicamentos e leite descartado, nos animais com retenção de placenta, foi estimado em R\$ 242,19 (\pm 85,98), sem considerar as perdas reprodutivas dos animais acometidos. Laven e Peters (30) relataram em seu trabalho que o custo total de cada animal acometido com retenção de placenta foi de 239,79 euros, aproximadamente o triplo do custo observado nesse estudo. Kimura et al. (32) relataram que a retenção de placenta representa um custo médio de 285 dólares por animal e Guard (31) relataram perda financeira média de 206 dólares/animal, aproximadamente o dobro do custo direto encontrado nesse estudo. O custo inferior decorrente da retenção de placenta observado nesse estudo relaciona-se a perdas diretas, desconsiderando custos reprodutivos, com outras enfermidades ou mesmo a morte de alguns animais, como inserido nos custos relatados por outros autores (30-32).

Tabela 1. Custos diretos decorrentes da retenção de placenta em vacas leiteiras de rebanhos da agricultura familiar, do Sudoeste Paranaense.

| Variável | Valor (Médio \pm DP) | Mínimo | Máximo |
|--|--------------------------------------|-----------|------------|
| Consulta veterinária + Medicamentos (R\$) | 99,10 \pm 18,53 | 50 | 135 |
| Produção leite/animal/dia (litros) | 21,22 \pm 6,85 | 8 | 36 |
| Valor leite descartado (produção dia + preço leite* R\$) | 143,09 \pm 82,63 | 0 | 397 |
| CUSTO TOTAL (R\$) | 242,19 \pm 85,98 | 50 | 467 |

* Fonte: CEPEA (24).

A perda econômica decorrente da retenção de placenta poderia ser consideravelmente reduzida com a adoção de medidas de prevenção que requerem a implantação de programas nutricionais e de saúde que melhorem o estado imunológico da vaca, evitando estresse, além de medidas de higiene e cuidado no auxílio ao parto (16). A adoção das medidas profiláticas descritas não foi observada em nenhuma das propriedades estudadas.

CONCLUSÃO

Nas condições desse estudo, ao se acompanhar o parto de 607 vacas de rebanhos leiteiros, de agricultura familiar, da Mesorregião Sudoeste do Paraná, conclui-se que 14,66% apresentaram retenção de placenta, variando de 2,9 a 50% entre as propriedades; 76% dos produtores consideraram placenta retida após 12 horas do parto e 82% solicitaram atendimento veterinário após o mesmo período; que o produtor desconhece a multiplicidade dos fatores envolvidos com a retenção de placenta; 64,05% dos casos ocorreram em época do ano com temperatura amena; 62,92% animais com idade superior a quatro anos; houve variação no tratamento instituído e que o custo direto decorrente da retenção de placenta é elevado (R\$ 242,19 \pm 85,98) mesmo sem considerar os custos reprodutivos dos animais acometidos.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná: sumário executivo. Curitiba: Iparde; 2009.

2. Telles TS, Tanaka JMU, Pellini T. Agricultura familiar: pecuária leiteira como locus das políticas públicas paranaenses. *Semina Cienc Agrar*. 2008;29:579-90.
3. Sartori R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. *Reprod Anim*. 2007;31:153-9.
4. Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci*. 1995;73:2820-33.
5. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2006;89:1267-79.
6. Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *J Dairy Sci*. 1999;82:2259-73.
7. LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J. Reproductive tract defense and disease in postpartum in dairy cows. *Theriongenology*. 2011;76:1610-8.
8. Horta AEM. Etiopatogenia e terapêutica da retenção placentária nos bovinos. In: *Anais 7a Jornadas Internacionales de Reproducción; 1994; Murcia. Murcia: ponencias y comunicaciones; 1994. p.181-92.*
9. Jones TC, Hunt RD, King NW. Sistema genital. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária*. 6a ed. São Paulo: Manole; 2000. p.1169-244.
10. Secco TGB. Retenção de placenta pós-parto [monografia]. São José do Rio Preto: Universidade Castelo Branco; 2007.
11. Nascimento EF, Santos RL. Patologias do útero. In: *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p.63-78.
12. Jainudeen MR, Hafez ESE. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal*. 7a ed. Barueri: Manole; 2004. p.141-55.
13. Toniollo GH, Silva MAM. Fisiologia, profilaxia do pré-parto, parto e puerpério em vacas. *Rev CFMV*. 2010;16:8-17.
14. Pimentel CA. Infertilidade na fêmea bovina. In: Riet-Correa F, Schild AL, Mendez MDC, Lemos RAA. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 2a ed. Santa Maria: Varela; 2001. p.361-81.
15. Christensen BW, Drost M, Troedsson MHT. Female reproductive disorders. In: Smith B. *Large animal internal medicine*. 4a ed. Mosby: Elsevier; 2009. p.1419-83.
16. Santos JEP. Doenças uterinas em vacas de leite: prevalência, fatores de risco e tratamento. In: *Anais do Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos; 2010; Uberlândia. Uberlândia: Conapec Jr; 2010. p.393-410.*
17. Nobre MM, Coelho SG, Haddad JPA, Campos EF, Lana AMQ, Reis RB, et al. Avaliação da incidência e fatores de risco da retenção de placenta em vacas mestiças leiteiras. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012;64:101-7.

18. Nobre MM. Avaliação da incidência, fatores de risco e impacto financeiro da retenção de placenta [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
19. Horta AEM. Fisiologia do puerpério na vaca. In: Anais 8a Jornadas Internacionales de Reproducción Animal; 1995; Santander. Santander: AERAI; 1995. p.73-84.
20. Zanetti MA, Neunhaus LED, Schalch E, Martins JH. Efeitos da suplementação de Selênio e vitamina E em bovinos leiteiros. Rev Bras Zootec. 1998;27:405-8.
21. Lima LG, Domingues JL. Uso do selênio na produção de bovinos. Revi Eletronica Nutritime. 2007;4:462-74.
22. Peligrino RC, Andrade LRM, Carneiro LF, Toledo Pinto EA. Retenção de placenta em vacas. Rev Cient Eletronica Med Vet. 2008;6:1-7.
23. Almeida VC. Geografia do Paraná [Internet]. Jacarézinho: AMF Vestibulares e Concursos; 2009 [cited 2016 Jan 10]. Available from: <http://geovest.files.wordpress.com/2012/09/parana.pdf>.
24. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Preços ao produtor. Valores nominais do leite: R\$/litro. Piracicaba: CEPEA; 2016 [cited 2016 Jan 10]. Available from: <http://www.cepea.esalq.usp.br/leite/?page=155>.
25. IBM SPSS® 20.0 - Programa de análise estatística. São Paulo: IBM; 2011.
26. Fernandes CAC. Infecções uterinas em bovinos. Hora Vet. 2001;21:27-35.
27. Rezende EV, Campos CC, Santos RM. Incidência da retenção de placenta e as consequências na produção de leite e na eficiência reprodutiva de vacas holandesas. Acta Sci Vet. 2013;41:1-6.
28. Binabaj FB, Farhangfar H, Azizian S, Jafari M, Hassan-Pour K. Logistic regression analysis of some factors influencing incidence of retained placenta in a holstein dairy herd. Iran J Appl Anim Sci. 2014;4:269-74.
29. Chaidate I, Somchai I, Jos N, Henk H. A cow-level association of ruminal pH on body condition score, serum beta-hydroxybutyrate and postpartum disorders in Thai dairy cattle. Anim Sci J. 2014;85:1-7.
30. Laven RA, Peters AR. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. Vet Rec. 1996;139:465-71.
31. Guard C. Retained placenta: causes and treatments. Adv Dairy Technol. 1999;11:81-6.
32. Kimura K, Goff JP, Kehrl J, Reinhardt TA. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. J Dairy Sci. 2002;85:544-50.
33. Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. Vet J. 2008;176:115-21.

34. Borges SM. Retenção placentária em bovinos de leite, um estudo de caso na ilha de São Miguel – Açores [dissertação]. Vila Real: Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2012.
35. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J.* 2008;176:102-14.
36. Drillich M, Pfützner A, Sabin HJ, Sabin M, Heuwieser W. Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology.* 2003;59:951-60.
37. Leite TE, Moraes JCF, Pimentel CA. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. *Cienc Rural.* 2001;31:467-72.
38. Fernandes CAC, Figueiredo ACS, Ferreira AM, Ferreira AM, Ferreira de Sá W. Variação sazonal da incidência de retenção de placenta em rebanhos leiteiros no sul do estado de Minas Gerais. *Rev Bras Cienc Vet.* 2000;7:179-81.
39. Fernandes CAC, Palhão MP, Ribeiro JR, Viana JHM, Gioso MM, Figueiredo ACS, et al. Associação entre oxitetraciclina e cloprostenol no tratamento de vacas leiteiras com retenção de placenta. *Rev Bras Cienc Vet.* 2012;19:178-82.
40. Kozicki LE. Aspectos fisiológicos e patológicos do puerpério em bovinos. *Arch Vet Sci.* 1998;3:9-19.
41. Dubuc J. Postpartum uterine diseases: prevalence, impacts, and treatments. *WCDS Adv Dairy Technol.* 2011;23:255-67.

Recebido em: 04/11/2015

Aceito em: 11/07/2016

***Crotalus durissus cascavella* VENOM TOXICITY TO MAMMALIAN CELLS**

Lucelina da Silva Araújo⁴
Danilo Damasceno Rocha¹
Daniel Araújo Viana⁴
João Alison de Moraes Silveira¹
Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos-Filho²
Diego Veras Wilke¹
Diva Maria Borges-Nojosa³
Claudia do O' Pessoa¹
Manoel Odorico de Moraes¹
Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista⁴

ABSTRACT

Snakes from the genus *Crotalus* gained significant space in the scientific field since the development of researches with their venom involving cytotoxic activity. *Crotalus durissus cascavella* is the only subspecies recorded of the Caatinga biome of Northeastern Brazil and it's noticed a lack of studies on its venom properties. The present study evaluated the crude venom of *C. d. cascavella* for its cytotoxic activity *in vitro* against both tumor cell lines and normal cells. The mechanism of cell death induced by this venom was also investigated. *C. d. cascavella* venom presented high cytotoxicity (IC₅₀ values ranging from 2.7 to 6.9 µg/mL) against five tumor cells lines: OVCAR-8 and SKOV3 (ovarian carcinomas), PC-3M (metastatic prostate carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), and SF-268 (glioblastoma) and PBMC as well. The cells treated with *C. d. cascavella* venom triggered the apoptotic pathway as confirmed by several methods. These results underline the biomedical potential of toxins from the venom from this species.

Keywords: apoptosis, *Crotalus durissus cascavella*, cytotoxicity, tumor cells, snake venom.

TOXICIDADE DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella* EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**RESUMO**

Serpentes do Gênero *Crotalus* ganhou espaço significativo no campo científico, desde o desenvolvimento de pesquisas com seu veneno envolvendo atividade citotóxica. A *Crotalus durissus cascavella* (*C.d.cascavella*) é uma subespécie característica da Caatinga do Nordeste do Brasil e faltam estudos sobre as propriedades de seu veneno. O presente estudo avaliou o veneno bruto de *C. d. cascavella* para a sua atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens de células tumorais e células normais. O mecanismo de morte celular induzida por este veneno também foi investigado. Observou-se alta citotoxicidade (valores de IC₅₀ entre 2,7-6,9 µg/mL) contra cinco linhagens de células tumorais, dentre elas: OVCAR - 8 e SKOV3 (carcinoma ovariano), PC-3M (carcinoma metastático de próstata), MCF-7 (carcinoma mamário), SF - 268 (glioblastoma) e PBMC. As células tratadas dispararam a cascata apoptótica, como confirmado por vários métodos demonstrados neste trabalho. Esses

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

² Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

³ Department of Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴ Veterinary Faculty, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. Contato principal para correspondência.

resultados reforçam, assim, o potencial biomédico e farmacológico das toxinas do veneno dessa espécie.

Palavras-chave: apoptose, *Crotalus durissus cascavella*, citotoxicidade, células tumorais, veneno separente.

TOXICIDAD DEL VENENO DE *Crotalus durissus cascavella* EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

RESUMEN

Las serpientes del género *Crotalus* ganaron espacio significativo en el campo científico desde el desarrollo de investigaciones con su veneno que involucran la actividad citotóxica. *Crotalus durissus cascavella* es la única subespecie grabadas del bioma de la Caatinga del nordeste de Brasil y los estudios carecen en sus propiedades del veneno. El presente estudio evaluó el veneno crudo de *C. d. cascavella* por su actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares tumorales y las células normales. El mecanismo de la muerte celular inducida por este veneno también se investigó. *C. d. cascavella* mostró una alta citotoxicidad (valores de IC50 que oscila desde 2,7 hasta 6,9 g/mL) contra cinco líneas de células tumorales, entre las cuales: OVCAR - 8 y SKOV3 (carcinoma de ovario), PC-3M (carcinoma metastásico de próstata), MCF-7 (carcinoma de mama), SF - 268 (glioblastoma) y PBMC también. Las células tratadas con *C. d. cascavella* disparó la cascada apoptótica, según lo confirmado por diversos métodos que se muestran en este trabajo. Estos resultados refuerzan así el potencial biomédico y farmacológico de las toxinas del veneno de esta especie.

Palabras clave: apoptosis, *Crotalus durissus cascavella*, citotoxicidad, células tumorales, veneno de serpiente.

INTRODUCTION

Venoms from snakes of the genus *Crotalus* gained significant interest due to their unique effects. This genus occurs in almost all countries of South America (except Chile and Ecuador). In Brazil, so far, there is only one specie of rattlesnake (cascavel) recognized, *Crotalus durissus* [Linnaeus, 1758] (1). However, according to the list of reptiles of Brazilian Society of Herpetology (SBH), six subspecies are considered: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, and *C. d. terrificus* (2). *C. d. cascavella* is the only subspecies recorded for the Caatinga biome of Northeastern Brazil (1,3).

Most pharmacological properties of snake venoms are determined by the presence of specific and biologically active substances, and approximately 95% of the dry weight of snake venoms is composed by proteins, which are responsible for almost all of the biological effects attributed to snake venoms (4,5). The venom of *Crotalus* presents itself as a complex-toxic enzyme, in which are found phosphodiesterase enzymes, amino oxidase I, 5-nucleotidase and toxins, such as, crotoxin, convulxin, crotamine and gyroxin (6). The crotoxin is considered the major component of the venom from this genus, and depending on the snake subspecies, differences in the protein isoform may be found, as well as differences in their activities (6).

Only few studies have been conducted by testing the crude venom and some isolated fractions from *C. durissus* species in mammalian cell lines, to access their toxicity and related antitumor potential (7,8). For *C. d. cascavella*, subspecies typical from the northeast of Brazil, until the present date there are no studies about the cytotoxic properties from its venom. Therefore, the aim of the present study was to analyze the venom from *C. d. cascavella* for its

cytotoxic activity against tumor cell lines and normal cells, as well as, its related mechanism of cell death induction.

MATERIAL AND METHODS

Venom of Crotalus durissus cascavella Wagler, 1824

The venom from the snake *Crotalus durissus cascavella* Wagler, 1824 was extracted in the Regional Center of Ophiology of Federal University of Ceará (NUROF-UFC), a scientific breeding which maintains species of venomous and non-venomous snakes (Registry CTF-IBAMA No. 480572). For this study, the specimens used were from the State of Ceará, with taxonomic identification of subspecies adequately confirmed.

Cell lines

The cytotoxic activity of the *C. d. cascavella* venom was tested against both tumor cell lines and primary culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The tested tumor cell lines were OVCAR-8 and SKOV3 (ovarian carcinoma), PC-3M (metastatic prostate carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), and SF-268 (glioblastoma). All these cell lines were kindly donated by the National Cancer Institute U.S. (Bethesda, MD). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA/USA) supplemented with 2% glutamine containing 10% fetal bovine serum (Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA/USA), 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA/USA) and incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. Cells were regularly split to keep them in a logarithmic phase of growth.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood from healthy, non-smoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sampling through a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO/USA). PBMC were washed and re-suspended at a concentration of 3×10^5 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C with 5% CO₂. At the beginning of the experiment, 4% phytohemagglutinin (Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA/USA) was added to stimulate cell growth.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was determined using the MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) assay (9). For that, cells were seeded (4×10^4 cells/mL for tumor cells and 3×10^5 cells/ml for PBMC) in 96-well plates 24 h prior to treatment with the venom (0.19 - 25 µg/mL) or vehicle control (saline) for 72 h. Three hours before the end of the incubation, medium was replaced by 150 µL of 0.5 mg/mL MTT (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO/USA) of each well. Then the formazan product was dissolved by replacing the later solution for 150 µL of DMSO and absorbance was measured at 595 nm using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA).

Hemolytic activity

A total of 3 Swiss female mice (*Mus musculus*) were obtained from the central animal house of Universidade Federal do Ceará, Brazil. The animals were kept under a 12:12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. Animals were treated according to the ethical principles for animal experimentation of CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) and CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais). The test was performed in 96-well plates using a 2% mouse erythrocytes suspension in 0.85% NaCl

containing 10 mM CaCl₂, following the method described by Jimenez et al. (10). The crude venom was tested at concentrations ranging from 3.9 µg/mL to 250.0 µg/mL. After incubation for 1h, 2h or 4h at room temperature the cells were spun down and the supernatant was transferred to another plate to measure the hemoglobin released at 540 nm using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA/USA).

Analysis of mechanisms involved in the cytotoxic activity of C. d. cascavella venom

OVCAR-8 cell line was chosen to perform experiments to investigate the mechanism of action of *C. d. cascavella* venom. Briefly, the cells were seeded at a density of 4x10⁴ cells/mL and treated with the venom at concentrations of 1, 2 and 4 µg/mL during 24h. The vehicle (0.85% NaCl) was used as negative control and paclitaxel at 0.05 µM (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO/USA) or doxorubicin at 0.5 µM (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO/USA) were used as positive controls.

Morphological changes analysis

To evaluate cell morphology, after the incubation period, cells were harvested, transferred to cytospin slides, fixed with methanol for 1 min and stained with hematoxylin and eosin. The morphological characteristics from untreated and treated cells were observed using a light microscope (Motic BA310, Moticam 2000, Causeway Bay, Hong Kong). In order to investigate nuclear alterations, the cells were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) Life Technologies). Briefly, after the incubation period, cells were fixed with 3.7 % formaldehyde and incubated with DAPI (5 µg/mL). After extensive washing with PBS, images were captured by confocal microscopy (LSM 710 Zeiss) excitation wave length 350 nm.

Flow cytometry analysis

Five thousand events were analyzed for each replicate in three independent experiments and cellular debris was omitted from the analysis. OVCAR-8 cells fluorescence was then determined by flow cytometry in a Guava EasyCyte Mini System cytometer using the CytoSoft 4.1 software (Guava Technologies, Hayward, CA/USA). Five thousand events were acquired on a gated region to exclude debris from the analysis.

Cell membrane integrity

The cell membrane integrity was evaluated using propidium iodide dye (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO/USA). Briefly, 100 µL suspension of treated and untreated OVCAR-8 cells were incubated with 5 µg/mL propidium iodide for 10 min. Fluorescence was measured and analyzed by cell number and membrane integrity.

Internucleosomal DNA fragmentation

DNA fragmentation and cell cycle distribution were analyzed by flow cytometry after DNA staining with propidium iodide. Briefly, 100 µL of treated and untreated OVCAR-8 cells were incubated for 30 min, in the dark, with a solution containing 5 µg/mL propidium iodide, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. Fluorescence was measured and DNA fragmentation and cell cycle distribution were analyzed.

Caspase activation

Treated and untreated cells were incubated with Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases (FLICA) 3 and 7 (Guava® Caspase 3/7 FAM kit, EMD Millipore Corporation Billerica, MA/USA) for 1h at 37° C under 5% CO₂ atmosphere. After washing with PBS, the cells were resuspended in the working solution (7-AAD 1:200 in 1× washing buffer) and analyzed immediately using flow cytometry.

Statistical analysis

For the MTT assay the inhibition concentration mean (IC₅₀) values of three independent experiments were determined by nonlinear regression using the software GraphPad® Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). The data from the flow cytometry analysis are presented as mean values ± S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. *p<0.05 compared to the negative control by ANOVA followed by Dunnett's test.

Ethical aspects

This project was submitted to the Ethics Committee on Animal Research at the State University of Ceará (number of the submission process: 11516651-3). All care were taken to preserve the health of the researchers and other professionals involved in this work and the environment in the areas where it conducts the research project.

RESULTS

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the venom was assessed against five tumor cell lines of different histotypes and PBMC using the MTT assay [9]. As shown in Table 1, the venom did not presented any selectivity, and its IC₅₀ values ranged from 1.5 µg/mL in PBMC to 6.9 µg/mL in SKOV3 cells, respectively. The lack of selectivity could imply in membrane damaging effects.

Table 1. Cytotoxic activity of *C. d. cascavella* venom on mammalian cells.

| | Cell lines | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | OVCAR-8 | PC-3M | MCF-7 | SF-268 | SKOV3 |
| Venom | 2.7 (2.6 – 2.9) | 2.4 (2.2 – 2.6) | 4.9 (4.2 – 5.8) | 4.1 (3.5 – 4.7) | 6.9 (5.9 – 8.0) |
| Doxorubicin | 0.3 (0.1 – 0.4) | 0.8 (0.7 – 0.9) | 0.4 (0.3 – 0.6) | 0.6 (0.4 – 0.9) | n.d. |

Data are presented as IC₅₀ values in µg/mL along with its respective confidence interval of 95% obtained by nonlinear regression from two independent experiments, performed in duplicate, after 72 h of incubation. n.d.= not determined.

Hemolytic activity

The analysis of hemolytic effects demonstrated that the venom did not cause any significant membrane damage to the erythrocytes (data not shown), suggesting that cytotoxicity should be related to more specific cellular pathways.

Morphological changes analysis

In a second set of experiments, *C.d. cascavella* venom apoptosis-inducing properties were assessed in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells. This cell lineage was chosen due to the preliminary results, wich showed in this particular lineage, the venom presented better activity.

Treated cells displayed apoptotic morphological features such as reduction in cell volume, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies (Fig 1A-1D). At the highest

tested concentration (4 $\mu\text{g/mL}$), the effects of the venom were more intense and characteristics of late apoptosis or necrosis could also be seen (Fig 1D). Negative control cells stained with DAPI showed a round nucleus, typical of interphase, while in doxorubicin treated cells the nucleus appears to be already fragmented. At the lowest concentration tested (1 $\mu\text{g/mL}$), the nucleus of the cells looks similar to the negative control cells (data not shown), being considered viable, and as the concentration increased, the number of cells with DNA fragmentation increased (Fig 1G and 1H).

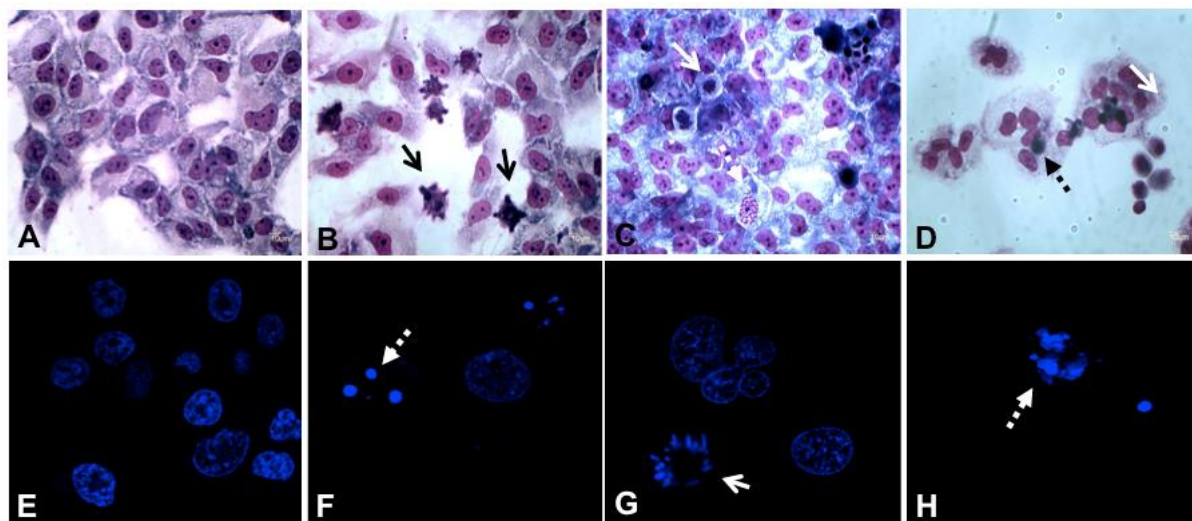


Figure 1. OVCAR-8 cells treated with *C. d. cascavella* venom show apoptosis characteristics. Control cells were incubated during 24 h without treatment (A and E); or treated with doxorubicin 0.5 μM (B and F); or treated with *C. d. cascavella* venom at 2 $\mu\text{g/mL}$ (C and G) or at 4 $\mu\text{g/mL}$ (D and H). Arrows: black, cell membrane blebbing; black with dashed line, pyknosis; white, atypical mitosis; white with dashed line, nuclear fragmentation. 400X

Cell membrane integrity

After observing the morphological features, we then decided to analyze some cellular and biochemical events to assess the mechanisms involved in cell death induced by *C. d. cascavella* venom. The antiproliferative activity of the venom was confirmed by flow cytometry (Fig 2A), with a significant reduction of cell number at concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$. The inhibition of cell proliferation can be associated with loss of cell membrane integrity and at 4 $\mu\text{g/mL}$, 36 % of treated cells presented membrane damage (Fig 2B), corroborating data from morphological analysis.

Internucleosomal DNA fragmentation

The analysis of DNA content through flow cytometry showed an increasing number of subdiploid population, indicating DNA fragmentation (Fig. 2C), while the distribution of cell cycle profile was not affected by *C. d. cascavella* venom (data not shown).

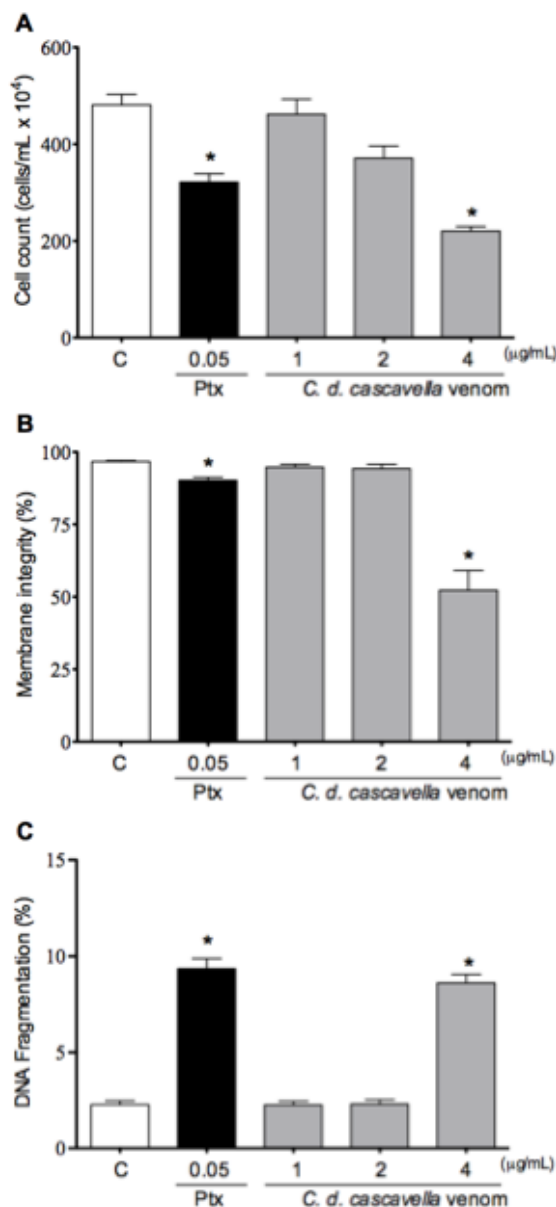


Figure 2. *C. d. cascavella* venom reduces cell proliferation accomplished by membrane damage and DNA fragmentation. Effect of *C. d. cascavella* venom on OVCAR-8 cell counting (A), membrane integrity (B) and DNA fragmentation (C) determined by flow cytometry, using propidium iodide after 24 h incubation. The negative control was treated with the vehicle saline (C). Paclitaxel (Ptx) at 0.05 μM was used as the positive control. Data are presented as mean values \pm S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared to the negative control by ANOVA followed by Dunnett's test.

Caspase activation

The apoptosis induction by *C. d. cascavella* venom was later confirmed through the activation of caspases 3 and 7 (Fig. 3). At the concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$, 32 % of the cells showed caspases activation. The caspases are one of the key executors of apoptotic process, generally being activated by several anti-tumoral drugs. This activation involves mainly two signaling pathways, one is the mitochondrial and the other is the cell death receptor pathway, which activate caspases 9 and 8 respectively.

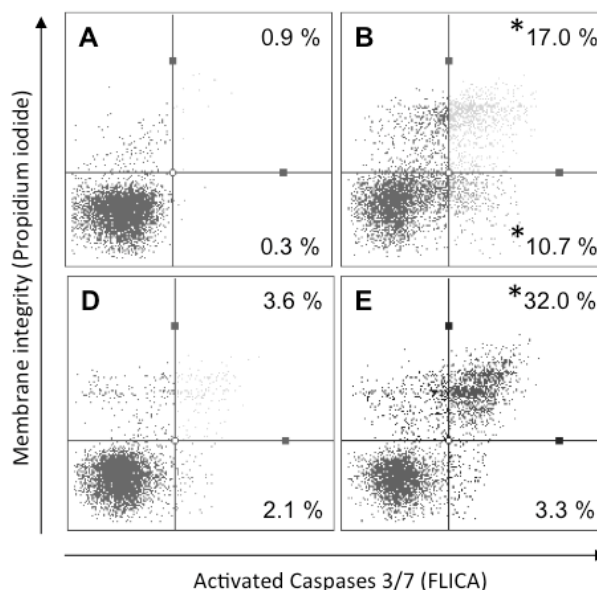


Figure 3. *C. d. cascavella* venom activates caspases 3 and 7. Caspases activation was determined by flow cytometry after 24 h incubation. **A**, Control; **B**, Doxorubicin 0.5 μM ; **C**, *C. d. cascavella* venom 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **D**, *C. d. cascavella* venom 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Percentage of cells in early and late apoptosis are indicated. Data are presented as mean values \pm S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared to the negative control by ANOVA followed by Dunnett's test.

DISCUSSION

Snake venoms are complex, being composed of a mixture of toxins, enzymes, growth factors and other proteins with several biological properties (11,12). The knowledge of snake venoms composition and activities have emerged as key factor to characterize envenomation and drawn the best therapeutic approach. Additionally, snake toxins have been considered a starting point in the development of highly specific biotechnological tools to treat diseases (13-15). In such context, cellular systems could be useful to rapidly evaluate direct effects on membrane integrity or cellular pathways to allow the understanding of venom local effects and possible biotechnological applications.

In fact, the major differences in *Bothrops* and *Crotalus* envenomation are related to the severity of local effects in the former, and major systemic myotoxicity and neurotoxicity in the later (16). The presence of hemolytic toxins in *Bothrops* venom has previously been reported (17), while *Crotalus* venom, generally, does not present a significant hemolytic activity (18).

The effects of snake venoms in tumor cells have been described in the literature (19-21). For *Crotalus* venom, Tamietti et al. (8) showed *C. d. terrificus* venom cytotoxic effects in CHO-K1 hamster ovarian carcinoma cells and suggested apoptosis induction as the main mechanism. Further, Soares et al. (7) confirmed apoptosis-inducing effects for *C. d. terrificus* venom in RT-2 glioblastoma cells (RT2) and GH3 benign pituitary adenoma cells. Crotoxin, the main component of *Crotalus* venom, have been described as the active principle against tumor cells (22), although the venom seemed to be much more active than crotoxin itself, suggesting the presence of other active cytotoxins.

Cell membrane integrity serves as a parameter of the viability of cells and at the initial stages of apoptosis. The cell shrinks while its membrane remains intact, however both cells undergoing late apoptosis or necrosis loose membrane integrity (23).

In order to differentiate wich pathway was responsible for the cells death, if the apoptotic or the necrotic pathway, the caspase assay would provide better evidences. Both

caspases may end up activating pathway 3 and 7 (24,25). Yan and collaborators (26) had already shown that crotoxin induces caspase 3 activation, that is accordance with our results.

In summary, it was showed that *C.d. cascavella* venom is cytotoxic against mammalian cells, causing cell death by apoptosis induction. Moreover, this study represents the first report on the biological activity of the venom from *C.d. cascavella* and highlights the biomedical importance of this species. Further studies are necessary to elucidate the exact mechanism involved in the cytotoxicity of *C. d. cascavella* venom as well as to identify the active components.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this article declare that there is no potential conflicts of interest including employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony and patent applications/registrations related to the current manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP, BNB/FUNDECI and PRONEX for the financial support in the form of grants and fellowship awards.

REFERENCES

1. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the western hemisphere. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press; 2004.
2. Bérnils RS, Costa HC. Répteis brasileiros: lista de espécies [Internet]. São Paulo: Sociedade Brasileira de Herpetologia; 2012 [cited 2012 Dec 01]. Available from: <http://www.sbherpetologia.org.br/>.
3. Uetz P. The reptile database [Internet]. Richmond: The Reptile Database; 2012 [cited 2012 Dec 01]. Available from: http://reptiletabase.reptarium.cz/species?Genus=Crotalus&species=durissus&search_param=%28%28taxon%3D%27Viperidae%27%29%29.
4. Bon C. Snake venom and pharmacopoeia. In: Bauchot R. Snakes a natural history. New York: Sterling Publishing Co; 1997. p.194-209.
5. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. 2006;63(24):3030-41.
6. Rangel AS, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. Toxicon. 2004;43(7):801-10.
7. Soares MA, Pujatti PB, Fortes-Dias CL, Antonelli L, Santos RG. *Crotalus durissus terrificus* venom as a source of antitumoral agents. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16(3):480-92.

8. Tamietti BP, Damatta RA, Cogo JC, Da Silva NS, Mittmann J, Pacheco-Soares C. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in cho-k1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom treatment. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(1):56-8.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(2):55-63.
10. Jimenez PC, Fortier SC, Lotufo TMC, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO, et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2003;287:93-101.
11. Tanjoni I, Butera D, Bento L, Della-Casa MS, Marques-Porto R, Takehara HA, et al. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*. 2003;42(7):801-8.
12. Braga MDM, Martins AMC, Amora DN, Menezes DB, Toyama MH, Toyama DO, et al. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. 2008;51(2):199-207.
13. Bon C. The natural toxins. *Biochimie*. 2000;82(9-10):791-2.
14. Fox JW, Serrano SMT. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr Pharm Des*. 2007;13(28):2927-34.
15. Fernandes-Pedrosa MF, Félix-Silva J, Menezes YAS. Toxins from venomous animals: gene cloning, protein expression and biotechnological applications. In: Baptista GR. An integrated view of the molecular recognition and toxinology: from analytical procedures to biomedical applications [Internet]. Rijeka: In Tech; 2013 [cited 2013 Apr 10]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications/toxins-from-venomous-animals-gene-cloning-protein-expression-and-biotechnological-applications>.
16. Zornetta I, Caccin P, Fernandez J, Lomonte B, Gutierrez JM, Montecucco C. Envenomations by *Bothrops* and *Crotalus* snakes induce the release of mitochondrial alarmins. *Plos Negl Trop Dis*. 2012;6(2):1526.
17. Martinez CE, Bonilla FC, Zavaleta A. Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Serpentes: Viperidae y Elapidae). *Rev Biol Trop*. 1991;39(2):311-4.
18. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Hering SE. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*. 1987;25(11):1163-8.
19. Das T, Bhattacharya S, Halder B, Biswas A, Das Gupta S, Gomes A, et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*. 2011;57(7-8):1065-72.

20. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas A K, Dasgupta SC, Giri B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J Exp Biol.* 2010;48(2):93-103.
21. Yan C, Yang Y, Gin Z, Gu Z, Reid P, Liang Z. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta pharmacol Sin.* 2007;28(4):540-8.
22. Ye B, Xie Y, Qin ZH, Wu JC, Han R, He JK. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(11):1397-401.
23. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19:124-8.
24. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6.
25. Mehmet H. Apoptosis: caspase find a new place to hide. *Nature.* 2002;403(6765):29-30.
26. Yan C, Liang Z, Gu Z, Yang Y, Reid P, Qin Z. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicon.* 2006;47(5):521-30.

Recebido em: 29/06/2015

Aceito em: 11/07/2016

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Mycobacterium fortuitum* POR MEIO DA ESPECTROFOTOMETRIA

Simone de Carvalho Balian¹
Sandra Abelardo Sanches¹

RESUMO

O *Mycobacterium fortuitum* é um agente oportunista causador de doença em humanos e animais. Além disso, é um modelo biológico para estudos experimentais em substituição ao *Mycobacterium bovis*, que é mais patogênico. Este estudo apresenta metodologia alternativa à contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo, para determinar a concentração do *Mycobacterium fortuitum* utilizando espectrofotometria. Utilizaram-se 14 amostras de *Mycobacterium fortuitum*, cultivadas em meio Lowesntein-Jensen, sendo oito delas com sete dias de cultivo e as demais entre oito e 14 dias de cultivo. Todas as amostras foram semeadas e incubadas a 37°C por 7 dias em estufa. Fizeram-se, de cada amostra, leituras das variáveis absorvância (Abs) e transmitância (T%) em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 560nm e 600nm. Comparando-se os valores obtidos de UFC, Abs e T% por meio da análise de regressão linear simples, pelo programa estatístico SAS versão 8.2, observou-se forte evidência estatística que o aumento do valor da transmitância está associado com o decréscimo do valor de UFC em placas, seguindo o modelo matemático: $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmitância}$, com valor de $p = 0,0025$ e uma repetibilidade de mais de 80%.

Palavras-chave: *Mycobacterium fortuitum*, espectrofotometria, unidades formadoras de colônias.

DETERMINATION OF *Mycobacterium fortuitum* CONCENTRATION BY SPECTROPHOTOMETRY

ABSTRACT

Mycobacterium fortuitum is an opportunistic agent which causes disease in human and animals. It is also a biological model for experimental studies instead of using *Mycobacterium bovis*, which is more pathogenic. This work presents an alternative methodology using spectrophotometry to count colony forming units (CFU) per milliliter of inoculum, in order to determinate *Mycobacterium fortuitum* concentration. Fourteen *Mycobacterium fortuitum* samples were cultivated in Lowenstein-Jensen culture media, considering that eight of them were seven days old cultures and the others were between eight and 14 days old. All samples were seeded and incubated at 37°C for 7 days in an incubator. For each sample, the variables absorbance (Abs) and transmittance (T%) were read with an spectrophotometer and wave length of 560nm and 600nm. When the values of CFU, Abs and T% were compared through simple linear regression analysis and using the statistic software SAS Version 8.2., it was observed strong statistical evidence that the increase of transmittance value is associated to the

¹ Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, área de concentração: Inspeção de Higiene de Alimentos. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Contato principal para correspondência.

decrease of CFU plate values, according to the mathematic model: $\text{LOG}_{10}(\text{CFU}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmittance}$, and p value = 0.0025 and a repeatability over 80%.

Keywords: *Mycobacterium fortuitum*, spectrophotometry, colony forming units.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Mycobacterium* POR ESPECTROFOTOMETRÍA

RESUMEN

Mycobacterium fortuitum es agente causante de enfermedad oportunista en humanos y animales. Es un agente biológico modelo para estudios experimentales que sustituye *Mycobacterium bovis*, que es más patógeno. Este estudio presenta una metodología alternativa para el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de inóculo para determinar la concentración de *Mycobacterium fortuitum* usando espectrofotometría. Catorce muestras se utilizaron *Mycobacterium fortuitum*, cultivadas en Lowenstein-Jensen, ocho de ellos de siete días de cultivo, y la otra entre 8 y 14 días en la cultura. Todas las muestras se colocaron en placas y se incubaron a 37°C durante 7 días en un invernadero. De cada muestra se hicieron lecturas las variables de absorbancia (Abs) y transmitancia (T%) en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 560 nm y 600 nm. La comparación de los valores de UFC, ABS y T% por análisis de regresión lineal simple, el estadístico SAS versión 8.2 del software, hubo una fuerte evidencia estadística de que el aumento del valor de transmitancia se asocia con la disminución en el valor de UFC chapado, siguiendo el modelo matemático: $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21,012 - 0,1936 * \text{transmitancia}$, con $p = 0,0025$ y una repetibilidad de más de 80%.

Palabras clave: *Mycobacterium fortuitum*, espectrofotometría, unidades formadoras de colonias.

INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium fortuitum* é um agente patogênico, porém oportunista, podendo causar doenças pulmonares, granulomas torácicos e cutâneos (1), com potencial zoonótico, causando mastite no gado e transmissão pelo leite (2). É comumente resistente aos quimioterápicos usados para o tratamento da tuberculose e no cultivo *in vitro* necessitam de dois a seis dias sob temperaturas de 25 a 37°C para formar colônias visíveis (3).

Este agente é frequentemente utilizado em pesquisas experimentais, em substituição ao *Mycobacterium bovis*, que é mais patogênico e por isso representa risco de acidentes ocupacionais com consequências mais graves (4,5,6).

Os trabalhos experimentais que empregam inóculos que dependem de quantidades de agentes pré-conhecidas, geralmente se utilizam da contagem padrão em placas para confirmar a concentração microbiana por unidade de volume do diluente, porém é um método lento e por isso muitas vezes pouco aplicável (1,6).

A espectrofotometria é um método indireto de mensuração da concentração das partículas presentes em um inóculo, sendo mais rápido e prático do que a contagem padrão em placas. O princípio do método é quantificar indiretamente a concentração de dispersos (micro-organismos) pela absorbância ou transmitância de forma rápida, objetiva, com

reduzidas variáveis inclusive da intervenção humana, enquanto que a quantificação por semeadura em placas de Petri é mais lenta e dependente de muitas variáveis a partir da ação humana (7). A semeadura em placas oferecerá resultados após tempo de incubação, multiplicação bacteriana de células viáveis e que também sejam cultiváveis e, posterior contagem de unidades formadoras de colônias, expressando uma realidade bastante distante do inoculo, quando de sua elaboração.

Com o interesse de confrontar uma metodologia rápida de avaliação da concentração de inóculos bacterianos com o método convencional de semeadura e cultivo em meios sólidos, o presente trabalho teve como objetivo estudar um protocolo alternativo à contagem em placas para determinar a concentração de dispersos em um inóculo, pela espectrofotometria. Nesta técnica a concentração da suspensão é avaliada a partir do grau de absorvância e transmitância de luz.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de uma estirpe de *Mycobacterium fortuitum*, NCTN 8573, cultivada em Lowenstein-Jensen pesou-se 0,600 g de colônias e diluiu-se em 24 mL de solução salina 0,85 % e 1 mL de solução salina com Tween* 0,05 %, totalizando um volume de 25 mL por inoculo (4,5). Os inóculos de número um até oito foram preparados com cultivos de sete dias de *M.fortuitum* em meio Lowenstein-Jensen a 37° C, enquanto que as amostras de número nove até 14 foram preparadas com cultivos entre 11 a 14 dias. A partir de cada inóculo, semeou-se e fez-se a leitura das diluições de 10⁻⁵ até 10⁻⁸, em Espectrofotômetro Micronal B582[®], com transmitância (T%) variando de 0 a 200; absorvância (Abs) de - 0,3 até + 3,0 e, comprimento de onda de 190 a 1.100 nm.

Para a leitura, 3mL de cada diluição, de 10⁻⁵ a 10⁻⁸, de cada inóculo, foi agitado em vórtex por 30 segundos e em seguida colocado em cubetas quadradas de 10 mm³ Micronal[®]. A leitura foi feita em duas funções do aparelho: absorvância (Abs) e porcentagem de transmitância (T%) nos comprimentos de onda 560 nm e 600 nm. Antes de cada leitura e mudança de comprimento de onda fez-se o ajuste, utilizando-se 3 mL de uma solução de 24 mL de solução salina 0,85 % com 1 mL de Tween 80² (0,05 %).

Para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo em UFC/mL, fez-se a contagem de três placas e a média simples, após cultivo em estufa B.O.D., 37°C, por sete dias.

Após tentativas de leituras com diferentes diluições, selecionaram-se as concentrações de 10⁻⁶ e 10⁻⁷. A diluição 10⁻⁵ apresentou-se incontável e a diluição 10⁻⁸ teve contagem entre zero e uma UFC/mL, não sendo possíveis de serem utilizadas. As leituras mais estáveis foram obtidas com as diluições 10⁻⁶ no comprimento 600 nm.

Os resultados foram analisados por regressão linear simples, pelo programa estatístico SAS versão 8.2. (SAS, 2001). Confrontaram-se as diluições com a escala de Mc Farland Bio Merieux[®], de 0,5 a 5.

² 80 Polyoxyethylensorbitanmonooleat – Zur Synthese – Merck[®]

RESULTADOS

Considerando a escolha da diluição 10^{-6} /mL e o comprimento de onda de 600 nm, a tabela 1 apresenta os resultados das leituras para absorvância (Abs), transmitância (T%) e contagens de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Tabela 1. Leituras de 14 amostras de inóculos de *Mycobacterium fortuitum* para absorvância (Abs), transmitância (%T) no comprimento de onda de 600 nm e contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) - São Paulo, 2015.

| Amostra - Inóculo <i>M. fortuitum</i> (10^{-6} /mL) | 2 | ABS 600 NM | T% 600 nm | <i>Mycobacterium</i> <i>fortuitum</i> UFC/mL |
|--|---|---------------|--------------|--|
| 1* | - | 0,009 | 102,2 | $1,8 \times 10$ |
| 2 | - | 0 | 100,0 | $5,4 \times 10^2$ |
| 3 | - | 0,005 | 101,4 | $2,6 \times 10$ |
| 4 | - | 0,002 | 100,8 | $2,2 \times 10$ |
| 5 | - | 0,001 | 100,3 | $3,3 \times 10$ |
| 6 | - | 0,003 | 100,9 | $2,9 \times 10$ |
| 7 | - | 0 | 100,0 | $4,8 \times 10$ |
| 8 | - | 0,001 | 100,4 | $4,1 \times 10$ |
| 9** | - | 0 | 100 | $1,1 \times 10^2$ |
| 10 | - | 0,001 | 100,3 | $1,6 \times 10^2$ |
| 11 | - | 0 | 100,3 | $9,6 \times 10$ |
| 12 | - | 0 | 100 | $1,3 \times 10^2$ |
| 13 | - | 0 | 100 | $1,5 \times 10^2$ |
| 14 | - | 0,001 | 100,2 | $9,5 \times 10$ |

* : Amostras de número um até oito: cultivadas por sete dias a 37°C

** : Amostras de número nove até 14: cultivadas entre 11 e 14 dias a 37°C

O confronto das diluições com a escala Mac Farland não se mostrou útil, por não discriminar concentrações entre 10^{-3} e 10^{-8} .

Tabela 2. Leituras das diluições dos inóculos na escala Mc Farland Bio Merieux®, São Paulo, 2015.

| Diluição do inóculo | Leitura na escala Mc Farland |
|-------------------------|---------------------------------|
| 10^0 | > 5 |
| 10^{-1} | 2 a 3 |
| 10^{-2} | 1 |
| 10^{-3} até 10^{-8} | < 0,5 |

O programa de análise dos dados ajustou os resultados em UFC/mL para Log 10, automaticamente, quando necessário. Obteve-se o coeficiente de determinação (R²) para indicar a porcentagem de sucesso na repetição do modelo e também o valor de p, erro máximo aceitável (0,05) para o modelo ser significativo.

Tabela 3. Valores do coeficiente de determinação (R^2) e de p obtidos após análise por regressão linear simples, dos valores lidos em espectrofotômetro para absorvância (Abs) e transmitância (T%) e contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), São Paulo, 2015.

| N | Variáveis | Valor R^2 | Valor p | Modelo Matemático | Premissas violadas do teste |
|----|-----------|-------------|---------|--|-----------------------------|
| 14 | UFC e Abs | 0,5781 | 0,0016 | $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 1.8793 + 91.272 * \text{Abs}$ | 2 de 5 |
| 14 | UFC e T% | 0,5415 | 0,0027 | $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 39.361 - 0.3742 * \text{T\%}$ | 0 de 5 |
| 08 | UFC e Abs | 0,6275 | 0,0191 | $\text{UFC} = 42.518 + 3233.7 * \text{Abs}$ | 1 de 5 |
| 08 | UFC e T% | 0,8044 | 0,0025 | $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{T\%}$ | 0 de 5 |

Adotou-se o modelo matemático $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmit}$ considerando os valores de p , de R^2 e o fato de nenhuma premissa ter sido violada.

Tabela 4. Valores de UFC segundo modelo matemático. $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmitância}$, São Paulo, 2015.

| Transmitância (%) | | UFC |
|---|---|-----|
| Espectrofotômetro Micronal B582®. Comprimento de onda 600 nm | Método convencional em placas de Petri | |
| 99 | 70,08 | |
| 100 | 44,87 | |
| 100,1 | 42,91 | |
| 100,2 | 41,04 | |
| 100,3 | 39,25 | |
| 100,4 | 37,54 | |
| 100,5 | 35,90 | |
| 100,6 | 34,34 | |
| 100,7 | 32,84 | |
| 100,8 | 31,41 | |
| 100,9 | 30,04 | |
| 101 | 28,73 | |
| 101,1 | 27,48 | |
| 101,2 | 26,28 | |
| 101,3 | 25,14 | |
| 101,4 | 24,04 | |
| 101,5 | 22,99 | |
| 101,6 | 21,99 | |
| 101,7 | 21,03 | |
| 101,8 | 20,11 | |
| 101,9 | 19,24 | |
| 102 | 18,40 | |
| 102,1 | 17,60 | |
| 102,2 | 16,83 | |

DISCUSSÃO

O estudo permitiu reconhecer qual a grandeza, absorvância ou transmitância, expressou melhor correlação com a contagem padrão em placas de um inóculo de *Mycobacterium fortuitum*.

Observando a tabela 3, constata-se evidências estatísticas de associação entre absorvância e UFC/mL e entre Transmitância e UFC/mL.

Com relação à absorvância, os testes estatísticos mostraram haver forte evidência estatística de que seu aumento está associado ao aumento nos valores esperados das concentrações de UFC/mL, tanto para 14 quanto para oito amostras testadas, porém o valor de p (0,0016) foi menor para 14 amostras do que para oito amostras (0,0191), enquanto que o valor de R^2 foi maior para oito amostras do que para 14. A associação entre os parâmetros analisados em relação à absorvância existe, porém violando duas premissas do teste para 14 amostras e, uma premissa para oito amostras.

Relativamente à transmitância, os testes estatísticos mostraram haver forte evidência estatística de que seu aumento está associado à diminuição nos valores esperados das concentrações em UFC/mL, tanto para 14 quanto para oito amostras. Os valores de p obtidos, respectivamente, são próximos (0,0027 e 0,0025), porém o valor de R^2 a partir da análise com oito amostras mostrou-se superior àquele com 14 amostras (0,8044 e 0,5415, respectivamente), sem violar nenhuma das premissas.

Observou-se também que o tempo de incubação prévio do inóculo é fator determinante nas variações das leituras no espectrofotômetro. As amostras com período de incubação mais longo, quando analisadas em separado, revelaram coeficientes de determinação mais altos (0,6275 para Abs e 0,8044 para T%) do que quando a análise foi realizada com todas as amostras (0,5781 para Abs e 0,5415 para T%). Este achado informa que a inclusão de amostras, sob diferentes condições levam à perda de repetibilidade do protocolo. É aconselhável fixar, rigorosamente, todas as variáveis para a preparação de inóculo e leitura no espectrofotômetro, incluindo-se, origem da cepa, intensidade e tempo de agitação, temperatura e tempo de incubação e tempo para leitura de todas as diluições testadas.

As amostras com mais de sete dias de cultivo, possivelmente continham um maior número de células viáveis e cultiváveis para uma mesma massa de bactérias. Esse fato explica porque em uma mesma leitura da transmitância, encontraram-se maiores valores de UFC, uma vez que a espectrofotometria é um método físico e não qualifica as partículas em suspensão.

Acredita-se que a leitura da transmitância de diluições seriadas de base 10 seja a mais indicada para se construir a curva de regressão linear dos dados. Dos quatro modelos matemáticos obtidos (tabela 3), o recomendado para o estudo de correspondência entre diluições e leitura em espectrofotômetro é o de transmitância dada pela fórmula: $LOG_{10}(UFC) = 21.012 - 0.1936 * Transmitância$.

O presente estudo desperta questionamentos quanto ao comportamento das leituras feitas a partir de outros micro-organismos. A utilização deste recurso representa a disponibilidade de um método rápido para a indicação de concentração de agentes em suspensões utilizadas em experimentações, porém algumas restrições e cuidados devem ser considerados como discutido anteriormente. Acredita-se ser necessário continuar com tais estudos buscando responder questões como: 1) espécies diferentes de bactérias, nas mesmas concentrações apresentam o mesmo comportamento em absorvância e transmitância? e 2) agentes com crescimento rápido (24h e 48h) oferecem a mesma correlação em absorvância e transmitância, nas leituras feitas em mesmo comprimento de onda e mesmas diluições, que aqueles agentes com crescimento lento (60 a 90 dias)?

CONCLUSÃO

Há uma forte evidência estatística que o aumento do valor da transmitância de uma amostra de inóculo de *Mycobacterium fortuitum*, cultivado por sete dias, está associado com o decréscimo do valor de UFC em placas, seguindo o modelo matemático $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * T\%$, com valor de $p = 0,0025$ e uma repetibilidade de mais de 80%. É fundamental o desenvolvimento de outros protocolos no estudo da aplicação da espectrofotometria na quantificação de agentes microbianos em inóculos utilizados em estudos experimentais de infecção e contaminação.

REFERÊNCIAS

1. Blanco RM, Inumaru VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E. et al. Estratégias para identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2002,61(2): 91-96.
2. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 2001, 38(6): 284-287. ISSN 1413-9596.
3. Carter GR, Cole Jr. JR Diagnostic procedures in veterinarian bacteriology and mycology, 1990. p.360.
4. Nishimoto, E. Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). São Paulo, 2006, 81p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
5. Starikoff KR. Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). São Paulo, 2006, 83p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
6. Parti RPS, Srivastava S, Gachhui R, Srivastava KK, Srivastava R. “Murine Infection Model for *Mycobacterium fortuitum*.” *Microbes and Infection*. 2005, 7(3): 349–55. doi:10.1016/j.micinf.2004.11.006.
7. Harrigan HF. Laboratory methods in food microbiology, cap.5, 3^a.ed., 1998.
8. SAS. Statistical Analysis System. SAS user’s guide: Versão 8.2. Cary: SAS, 2001. 1 CD – ROOM.

Recebido em: 06/04/2015

Aceito em: 08/08/2016

EVOLUÇÃO DAS TAXAS DE VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE BOVINA SEGUNDO AS ÁREAS DE RISCO PARA FEBRE AFTOSA NO ESTADO DO PARÁ

Andrea Ferreira Nobre¹
Susiclay Barros Neto²
Glauccio Antonio da Rocha Galindo³
Flávia da Cunha Rodrigues²
Giovani Luidy Girardeli⁴
Ana Julia Silva e Alves⁵
Márcia Marinho⁶
Luzia Helena Queiroz⁶

RESUMO

Foi investigada a evolução das taxas de vacinação contra brucelose, estabelecida pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) segundo as áreas de risco delimitadas para o Estado pelo Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA) no Estado do Pará. Utilizaram-se os dados de vacinação do rebanho bovino nos anos de 2008 a 2011 da Agência de Defesa Agropecuária do Pará. Em 2008 as taxas de vacinação média de brucelose nas áreas livre de febre aftosa com vacinação (área 1), de médio (área 2) e alto risco (área 3) foram de 36,3%, 25,3% e 22,5%, respectivamente. No ano de 2011, estes valores aumentaram, com médias de 61,7%, 50,9% e 48,3% respectivamente, sem diferirem estatisticamente. A porcentagem de municípios da área 1, com taxa de vacinação acima de 80%, apresentou aumento de 5,1 vezes de 2008 para 2011, enquanto a área 2 teve aumento de oito vezes e a área 3 foi de 0% para 28%. Os resultados sugerem que o aumento das taxas de vacinação contra brucelose bovina no Pará pode ter sido influenciado pela mudança na classificação de risco para Febre Aftosa em 2010.

Palavras-chave: cobertura vacinal, brucelose, Febre Aftosa, risco sanitário.

BOVINE BRUCELLOSIS VACCINATION RATES EVOLUTION IN DIFFERENT FOOT AND MOUTH DISEASE RISK-RATING REGIONS IN PARÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT

The evolution of brucellosis vaccination rates, established by the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), was investigated, based on the risk rating of the areas covered by the National Program of Eradication of Foot and Mouth Disease (PNEFA) in Pará State, Brasil. The Agribusiness Protection Agency of Pará provided the vaccination data of cattle from 2008 to 2011. During 2008, the average vaccination rates against brucellosis were 36.3%, 25.3%, and 22.5%, in areas assessed as disease free with vaccination (1), medium risk (2) and high risk(3), respectively. In 2011 these figures increased with averages of 61.7%, 50.9%, and 48.3% respectively, but not statistically different. The percentage of municipalities in area 1 with vaccination rate above 80%

¹ Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará-ADEPARÁ. Gerência Regional de Abaetetuba, ULSA de Barcarena-PA.

² Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ. Gerente de Programa, Belém-PA.

³ Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ. Diretor Operacional, Belém-PA.

⁴ Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ. Gerência Regional e ULSA de Altamira-PA.

⁵ Docente no Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU-São Paulo.

⁶ Professora do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMVA-UNESP. Contato principal para correspondência.

increased 5.1 times from 2008 to 2011, while in area 2 it increased eight times and in area 3 it increased from 0% to 28%. The results suggest that the significant increase of vaccination rates against bovine brucellosis may have been influenced by the risk assessment change regarding FMD in Pará, in 2010.

Keywords: vaccination coverage, brucellosis, Foot and Mouth Disease, sanitary risk.

EVOLUCIÓN DE LAS TASAS DE VACUNACIÓN CONTRA LA BRUCELOSIS DE ACUERDO CON LAS ZONAS DE RIESGO PARA FIEBRE AFTOSA EN EL ESTADO DE PARÁ

RESUMEN

Se investigó la evolución de las tasas de vacunación contra brucelosis establecidos por el Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis (PNCEBT) conforme las áreas de riesgo definidos para el Estado por el Programa Nacional de Erradicación de la Fiebre Aftosa (PNEFA) en el Estado de Pará. Utilizamos los datos de vacunación del rebaño de la especie bovina para los años 2008 a 2011 la Agencia de Defensa Agropecuaria de Pará. En 2008, las tasas medias de vacunación contra la brucelosis en zonas libres de fiebre aftosa con vacunación (zona 1), zona de medio (zona 2) y alto riesgo (área 3) fueron 36,3%, 25,3% y 22,5%, respectivamente. En 2011 estas cifras aumentaron, con un promedio de 61,7%, 50,9% y 48,3% respectivamente, sin diferir estadísticamente. El porcentaje de municipios de la zona 1, con las tasas de vacunación superior al 80%, aumentó en 5,1 veces desde 2008 hasta 2011, mientras que la área 2 se incrementó en ocho veces y el área 3 fue del 0% al 28%. Los resultados sugieren que el aumento de las tasas de vacunación de brucelosis bovina en Pará puede haber sido influenciado por el cambio en la clasificación de riesgo de la fiebre aftosa en 2010.

Palavras chave: tasas de vacunación, brucelosis, Fiebre Aftosa, riesgo sanitario.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma importante zoonose causada pela bactéria *Brucella abortus*, estando disseminada por todo o território nacional, tanto nos bovinos de corte como nos de leite (1). A febre aftosa é uma doença vesicular causada por Aphtovirus, que afeta animais biungulados, principalmente bovinos (2). Ambas as doenças são de grande importância para a bovinocultura nacional, estão incluídas na lista de doenças de notificação obrigatória tanto no país quanto internacional (3,4) e possuem como medidas profiláticas compulsórias a vacinação e o controle de trânsito (1,5).

O Estado do Pará aderiu ao Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2004, instituindo, a partir de janeiro de 2005, a exigência da comprovação da vacinação de bezerras entre três e oito meses de idade contra a brucelose com a vacina B19, para a emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) para transporte de animais, para qualquer finalidade, inclusive comercialização (6).

Para atender ao Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA) o Estado foi dividido em três circuitos pecuários. A partir de 2007, houve alteração no *status* sanitário destes circuitos, adotando-se a classificação baseada na gestão de risco para a febre aftosa (7), subdividindo o Estado em três áreas. A área 1 (Centro Sul) passou a ser livre de febre aftosa com vacinação, possível de comercializar animais e subprodutos com todos os demais Estados do Brasil. A área 2, foi considerada de médio risco com vacinação,

comercializando produtos de origem animal apenas com áreas livres, sob condições de cumprimento de determinados requisitos, enquanto a área 3 foi definida como de alto risco com vacinação, que só poderia comercializar animais com os municípios de mesma classificação de risco, sendo proibida a saída de animais para as demais áreas.

No ano de 2010, após nova avaliação de risco para a febre aftosa, houve a reclassificação destas áreas (8), e a área 3 passou de alto risco para médio risco, podendo comercializar animais e produtos com outras áreas, com as quais anteriormente não era permitido. A partir do ano de 2011, o Estado do Pará e outros Estados das regiões Norte e Nordeste passaram a pleitear o *status* de área livre com vacinação, situação que foi confirmada no ano de 2013, quando a totalidade do Estado foi declarada livre, podendo comercializar animais com todos os outros Estados do Brasil com a mesma condição sanitária e ainda exportar animais para outros países (9).

Considerando que, para o comércio de bovinos é necessária a emissão da GTA e que esta só pode ser emitida mediante a vacinação das fêmeas contra brucelose formulou-se a hipótese de que, no período de 2008 a 2011, nas áreas de médio e alto risco, nas quais não era permitido o comércio de animais para a área livre e nem o abate em frigoríficos para exportação, a porcentagem de vacinação contra brucelose seria menor do que na área livre e tenderia a aumentar à medida que houvesse alteração do *status* sanitário. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a evolução das taxas de vacinação contra brucelose bovina e verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas das áreas de classificação de risco para febre aftosa delimitadas pelo PNEFA, no período de 2008 a 2011, no Estado do Pará, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O Estado do Pará, com uma área de 1.247.954,666 Km², possui uma população de 7.581.051 habitantes. Destes, 5.191.559 (68,48%) estão na área urbana e 2.389.492 (31,52%) na área rural (10). O Estado registrou, em 2012, um rebanho efetivo de 19.541.556 bovinos (11) distribuídos em 144 municípios e entre as 18 gerências regionais da Agência de Defesa Agropecuária do Pará - ADEPARÁ (Figura 1a).

O Estado foi dividido em circuitos pecuários englobando várias regionais, havendo algumas regionais que possuem municípios em diferentes áreas. A área 1, que compreende a região centro sul inclui seis regionais: Itaituba, Altamira, Tucumã, Redenção, Xinguara, São Bento do Araguaia e parte das regionais de Marabá, Santarém e Tucuruí, com 44 municípios e uma população bovina estimada, em 2011, de 14.500.000 de animais. A área 2 compreende a região do Salgado (próxima ao mar) e a região metropolitana de Belém. É composta por cinco regionais agrícolas: Capanema, Capitão Poço, Castanhal, Paragominas e Rondon do Pará e parte das regionais e Abaetetuba, Marabá, Soure e Tucuruí, com 67 municípios e uma população bovina de aproximadamente 3.000.000 de animais. A área 3 compreende a região do Baixo Amazonas e o Marajó, abrangendo as regionais de Almeirim e Breves e parte das regionais de Santarém, Soure e Abaetetuba, sendo composta por 32 municípios com uma população bovina de aproximadamente 950.000 animais (Figura 1b). Durante o período de 2008 a 2011, a área 1 manteve a classificação de livre de febre aftosa com vacinação, e a área 2 de médio risco para a doença. A área 3 foi considerada como de alto risco para a doença até outubro de 2010 e médio risco a partir de então (8).

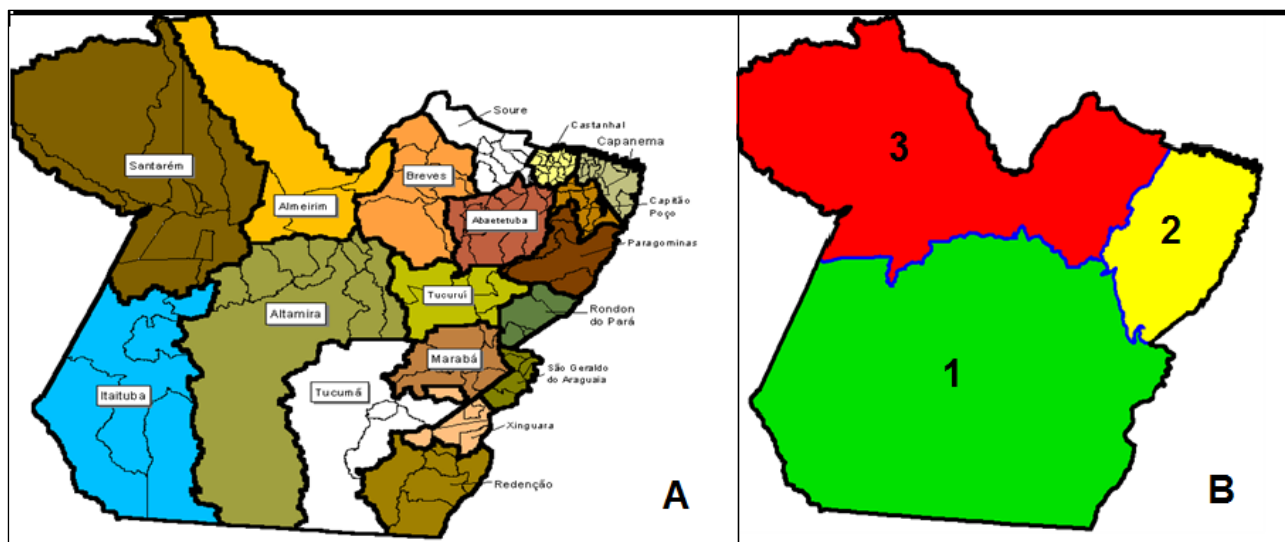


Figura 1. Representação geográfica do Estado do Pará subdividido segundo gerências regionais (A) e as áreas de risco para febre aftosa, em 2008 (B) classificadas como área livre (1), de médio risco (2) e de alto risco (3).

Os dados relativos ao número de animais vacinados com vacina B19 foram provenientes da Divisão do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose da ADEPARÁ, compilados por meio da condensação dos relatórios técnicos mensais elaborados a partir das informações dos médicos veterinários cadastrados no PNCEBT e enviados pelas Unidades Locais de Sanidade Agropecuária (ULSA) à gerência central.

As taxas de cobertura vacinal de cada município (porcentagem de fêmeas vacinadas/total de fêmeas existentes até um ano de idade) foram agrupadas segundo a área de risco e conforme as regionais para permitir a comparação das frequências relativas (%) entre as áreas e dentro de cada área. As informações obtidas foram armazenadas em um banco de dados no programa Microsoft Excel 2007[®]. A partir das porcentagens de vacinação de cada município no período de 2008 a 2011, foram calculadas as médias, desvio padrão e valores de máxima e mínima para cada área.

As frequências relativas (%) foram calculadas e dispostas em forma de mapas temáticos, caracterizando uma série histórica de 2008 a 2011. Os mapas temáticos foram elaborados por meio do software livre Quantum Gis e as porcentagens de vacinação foram plotadas em forma de cores, de acordo com faixas de taxas de vacinação.

A análise estatística foi calculada por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, utilizando-se o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (12) versão 8.0 e adotando-se o nível de significância de 5%, para comparar as taxas de vacinação contra brucelose bovina entre as áreas de risco para febre aftosa. Considerou-se a hipótese nula de que não houve diferença da taxa de vacinação entre os circuitos e a hipótese alternativa de que houve a diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das médias das taxas de vacinação em todas as áreas do Estado (Tabela 1) estiveram abaixo de 62%, taxa inferior à esperada pelo PNCEBT (80%) para que a doença atinja níveis de prevalência que permitam passar à fase de erradicação (1). Observou-se diferença significativa entre as porcentagens de vacinação na área 1 (livre) em comparação com as áreas 2 (médio risco) e 3 (alto e médio risco) nos anos de 2008 até 2010. No ano de 2011 houve um aumento na porcentagem de animais vacinados nas três áreas, não havendo diferença significativa entre a área livre e as áreas de médio risco.

Sugere-se que aumento progressivo nas taxas de vacinação contra brucelose na área 1 esteja relacionado com o aumento da exportação de gado vivo do Estado do Pará para os países da Venezuela, do Líbano e do Egito, que resultou em uma elevação no número de bovinos exportados vivos de 382.191 em 2008, para 616.663 em 2010 (13).

Tabela 1. Valores de média, desvio padrão (D.P.), mínima e máxima, referentes às porcentagens de bezerras bovinas vacinadas contra brucelose (B19) segundo a área do Estado do Pará, no período de 2008 a 2011. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

| Área* | Ano | | | |
|-------|--|--|--|---|
| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
| | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) |
| 1 | 36,3 ± 26,5 ^{a**} (2,0 - 95,8) | 55,9 ± 29,9 ^a (2,0 - 99,7) | 58,3 ± 29,1 ^a (10,2 - 100,0) | 61,7 ± 29,0 ^a (1,5 - 100,0) |
| 2 | 25,3 ± 21,8 ^b (1,6 - 87,2) | 33,7 ± 30,2 ^b (0,0 - 95,8) | 31,8 ± 32,3 ^b (0,0 - 100,0) | 50,9 ± 37,0 ^a (0,0 - 100,0) |
| 3 | 22,5 ± 22,1 ^b (0,0 - 79,9) | 34,2 ± 27,8 ^b (0,0 - 89,8) | 18,1 ± 22,3 ^b (0,0 - 70,0) | 48,3 ± 35,0 ^a (0,0 - 100,0) |

* Área 1= livre de febre aftosa com vacinação; Área 2= médio risco; Área 3= alto risco (2008-2010) e médio risco em 2011.

**Valores seguidos de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$)

Na área 2, onde está localizado o rebanho de gado de elite, o aumento gradativo nas porcentagens de animais vacinados também pode ter sido influenciado pelo fato de que o Estado começou a pleitear, no início de 2011, a alteração da classificação desta área de médio risco para livre de febre aftosa com vacinação, o que aumentaria a possibilidade de venda para mercados consumidores com melhores ofertas de preços.

Considerando as diferenças geográficas, de manejo e comercialização de animais em cada uma das áreas e nas gerências regionais, são sumariadas nas Tabelas 2 a 4, as porcentagens médias de vacinação contra brucelose segundo as regionais.

Na área 1 (Tabela 2), a regional de Altamira apresentou as maiores porcentagens de vacinação durante três dos quatro anos (56,8%, 84,7% e 77,9%), diferindo significativamente da regional de Redenção em 2008 e da regional de Marabá em 2009. A regional de Redenção apresentou as menores porcentagens de vacinação nos anos de 2008 e 2010 (14,7% e 23,7%) e diferiu significativamente da regional de Altamira em 2008 e Xinguara em 2010.

De acordo com Amaku et al. (14), para coberturas vacinais acima de 70% o tempo necessário para reduzir a prevalência da brucelose bovina para 2% é estimado em dez anos. Assim, com base nos resultados acima, podemos inferir que as regionais de Altamira, Tucumã e Xinguara são as três regionais que conseguirão controlar a doença no Estado, caso sejam mantidas as taxas apresentadas a partir de 2010, que foram muito próximas ou superiores a 70% de cobertura vacinal. Em contraste, entretanto, ocorre o inverso com as regionais de Marabá e Tucuruí, que apresentaram as menores médias de vacinação dentre as regionais da área 1.

Entre as regionais da área 2 foi observada variação acentuada nas taxas de vacinação ao longo dos anos (Tabela 3). Particularmente no ano de 2008, apenas duas regionais apresentaram porcentagem de vacinação média igual ou superior a 30% (Paragominas e Castanhal). No ano de 2009 houve um aumento nas taxas de vacinação na maioria das regionais, com exceção de Abaetetuba e Capanema que continuaram com média abaixo de 30% (16,9% e 14,4%, respectivamente).

Tabela 2. Valores de média, desvio padrão (D.P.), mínima e máxima, referentes às porcentagens de bezerras bovinas vacinadas contra brucelose (B19) segundo as regionais localizadas na área 1 do Estado do Pará, no período de 2008 a 2011. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

| Regional Área 1 | Ano | | | |
|--------------------|--|--|--|--|
| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
| | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) |
| Altamira | 56,8 ± 22,4 ^{a*} (34,7 - 94,0) | 84,7 ± 20,4 ^a (39,9 - 99,7) | 75,2 ± 15,8 ^{ab} (52,1 - 97,3) | 77,9 ± 23,4 ^a (27,9 - 100,0) |
| Itaituba | 43,8 ± 28,5 ^{ab} (20,1 - 86,6) | 47,5 ± 18,9 ^{ab} (20,6 - 72,2) | 45,1 ± 17,5 ^{ab} (21,4 - 62,6) | 61,9 ± 25,3 ^a (32,1 - 100,0) |
| Marabá | 26,8 ± 28,2 ^{ab} (9,1 ± 76,3) | 24,6 ± 18,9 ^b (2,0 - 41,3) | 44,9 ± 26,6 ^{ab} (13,6 - 76,5) | 41,1 ± 34,2 ^a (11,9 - 96,9) |
| Redenção | 14,7 ± 12,3 ^b (2,0 - 31,1) | 30,8 ± 29,9 ^{ab} (5,8 - 81,9) | 23,7 ± 10,6 ^b (10,2 - 35,7) | 56,0 ± 31,5 ^a (21,0 - 100,0) |
| Santarém** | 37,3 ^{ab} | 69,8 ^{ab} | 43,9 ^{ab} | 100 ^a |
| São Geraldo | 38,5 ± 32,1 ^{ab} (6,7 - 95,8) | 60,1 ± 21,7 ^{ab} (38,4 - 83,2) | 53,5 ± 23,2 ^{ab} (17,4 - 82,7) | 59,1 ± 33,8 ^a (1,5 - 100,0) |
| Tucumã | 23,7 ± 6,9 ^{ab} (14,0 - 29,3) | 45,2 ± 30,4 ^{ab} (18,0 - 87,3) | 68,6 ± 38,3 ^{ab} (16,5 - 99,9) | 65,7 ± 26,1 ^a (32,3 - 86,7) |
| Tucuruí | 29,4 ± 25,2 ^{ab} (4,2 ± 73,9) | 74,5 ± 24,7 ^{ab} (49,8 - 99,2) | 42,0 ± 21,2 ^{ab} (26,2 - 66,1) | 36,0 ± 27,7 ^a (13,0 - 66,7) |
| Xinguara | 41,5 ± 26,1 ^{ab} (15,1 - 90,5) | 67,3 ± 26,7 ^{ab} (32,5 - 99,3) | 97,8 ± 3,2 ^a (91,5 - 100,0) | 69,3 ± 22,6 ^a (45,8 - 100,0) |

* Valores seguidos de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

** Valor correspondente a apenas um município desta regional que pertence à área 1.

No ano de 2011 somente duas regionais tiveram a média abaixo de 50% de vacinação sendo que a regional de Capanema apresentou taxa acima de 70%. Na regional de Soure, apenas um município, que vacinou 100% das bezerras, pertence à área 2, os demais estão localizados na área 3 (Tabela 4). Assim, de acordo com a simulação de Amaku et al. (14), caso sejam mantidos estas taxas de vacinação (entre 50 e 70%), esse circuito demorará cerca de vinte anos para a redução da prevalência de brucelose a 2%.

Na área 3, as regionais com as piores taxas de vacinação foram Abaetetuba e Breves, apresentando porcentagens médias de até 0% embora em alguns anos não tivessem registrado fêmeas em idade de vacinação (Tabela 4). Nesta área, a única regional que atingiu a taxa acima de 70% foi a de Soure, e nenhuma delas obteve a taxa mínima esperada pelo PNCEBT (1).

Nos mapas de distribuição das taxas de vacinação por municípios, durante o período de estudo (Fig. 2), observa-se que, no ano de 2008 (Fig. 2a), todos os 44 municípios da área livre para febre aftosa com vacinação (área 1) possuíam bezerras em idade de vacinação e, destes, apenas cinco (11,36%) atingiram taxa de vacinação acima de 80%. Na área 2, de médio risco, 76,1% (51/67) dos municípios possuíam bezerras em idade de vacinação e apenas 3,92% (2/51) atingiram a taxa esperada, sendo que praticamente metade (49%) apresentaram taxas abaixo de 20%. Na área 3, de alto risco, 62,5% dos municípios possuíam bezerras entre três a oito meses, porém em nenhum deles a taxa de 80% foi atingida, estando abaixo de 20% em 60% dos municípios.

Tabela 3. Valores de média, desvio padrão (D.P.), mínima e máxima, referentes às porcentagens de bezerras bovinas vacinadas contra brucelose (B19) segundo as regionais localizadas na área 2 do Estado do Pará, no período de 2008 a 2011. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

| Regional | Ano | | | |
|---------------|---|--|--|--|
| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
| Área 2 | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) |
| Abaetetuba | 22,1 ± 31,4 ^{a*} (3,3 - 87,2) | 16,9 ± 30,6 ^b (0,0 - 90,0) | 26,9 ± 30,7 ^a (0,0 - 97,0) | 42,7 ± 41,2 ^a (1,1 - 100,0) |
| Capanema | 20,9 ± 21,0 ^a (2,9 - 73,0) | 14,4 ± 19,8 ^b (0,0 - 73,8) | 17,0 ± 29,5 ^a (0,0 - 98,8) | 71,7 ± 34,9 ^a (11,6 - 100,0) |
| Capitão Poço | 24,1 ± 14,6 ^a (3,6 - 47,4) | 47,2 ± 27,9 ^{ab} (6,0 - 89,2) | 32,5 ± 27,5 ^a (0,0 - 81,6) | 60,6 ± 35,4 ^a (15,4 - 100,0) |
| Castanhal | 30,1 ± 26,2 ^a (6,5 - 26,2) | 40,5 ± 24,7 ^{ab} (0,0 - 92,6) | 37,0 ± 34,8 ^a (0,0 - 98,7) | 50,1 ± 34,4 ^a (1,0 - 100,0) |
| Marabá** | 26,6 ^a | 87,8 ^a | 42,6 ^a | 45,6 ^a |
| Paragominas | 36,7 ± 21,0 ^a (10,7 - 67,1) | 50,4 ± 35,9 ^{ab} (20,6 - 95,8) | 52,8 ± 28,4 ^a (26,0 - 100,0) | 45,8 ± 20,5 ^a (14,6 - 65,9) |
| Rondon | 23,7 ± 5,9 ^a (18,1 - 29,3) | 50,8 ± 35,0 ^{ab} (22,4 - 94,8) | 53,3 ± 31,9 ^a (29,9 - 99,7) | 59,4 ± 28,5 ^a (39,2 - 100,0) |
| Soure | 16,7 ^a | 45,8 ± 45,2 ^{ab} (13,8 - 77,8) | 4,6 ± 8,0 ^a (0,0 - 13,9) | 100 ^a |
| Tucuruí | 15,1 ± 20,2 ^a (1,6 - 38,3) | 34,6 ± 29,1 ^{ab} (4,6 - 62,7) | 52,0 ± 48,1 ^a (1,6 - 97,4) | 51,4 ± 30,2 ^a (30,8 - 86,0) |

* Valores seguidos de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$)

** Valor correspondente a apenas um município desta regional que pertence à área 2.

Tabela 4. Valores de média, desvio padrão (D.P.), mínima e máxima, referentes às porcentagens de bezerras bovinas vacinadas contra brucelose (B19) segundo as regionais localizadas na área 3 do Estado do Pará, no período de 2008 a 2011. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

| Regional | Ano | | | |
|---------------|---|--|---|--|
| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
| Área 3 | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D.P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) | Média ± D. P. (Mín - Máx) |
| Abaetetuba | 11,9 ± 13,1 ^{a*} (2,6 - 21,1) | 0,7 ± 0,9 ^a (0,0 - 1,3) | 0 ^b | — |
| Almeirim | 35,0 ± 30,9 ^a (9,4 - 79,9) | 45,6 ± 37,3 ^a (0,0 - 89,8) | 24,4 ± 20,9 ^{ab} (0,0 - 48,3) | 38,5 ± 3,0 ^a (35,8 - 41,7) |
| Breves | 18,3 ^a | — | 3,4 ± 7,6 ^b (0,0 - 16,9) | 33,0 ± 29,1 ^a (2,5 - 69,2) |
| Santarém | 30,9 ± 20,4 ^a (5,4 - 61,2) | 41,7 ± 27,4 ^a (7,9 - 73,1) | 36,2 ± 25,2 ^a (0,3 - 70,0) | 59,1 ± 32,7 ^a (0,4 - 97,9) |
| Soure | 5,2 ± 4,9 ^a (0,0 - 12,0) | 36,8 ± 24,8 ^a (2,0 - 77,8) | 9,6 ± 14,0 ^{ab} (0,0 - 36,3) | 78,2 ± 21,5 ^a (35,0 - 100,0) |

* Valores seguidos de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$)

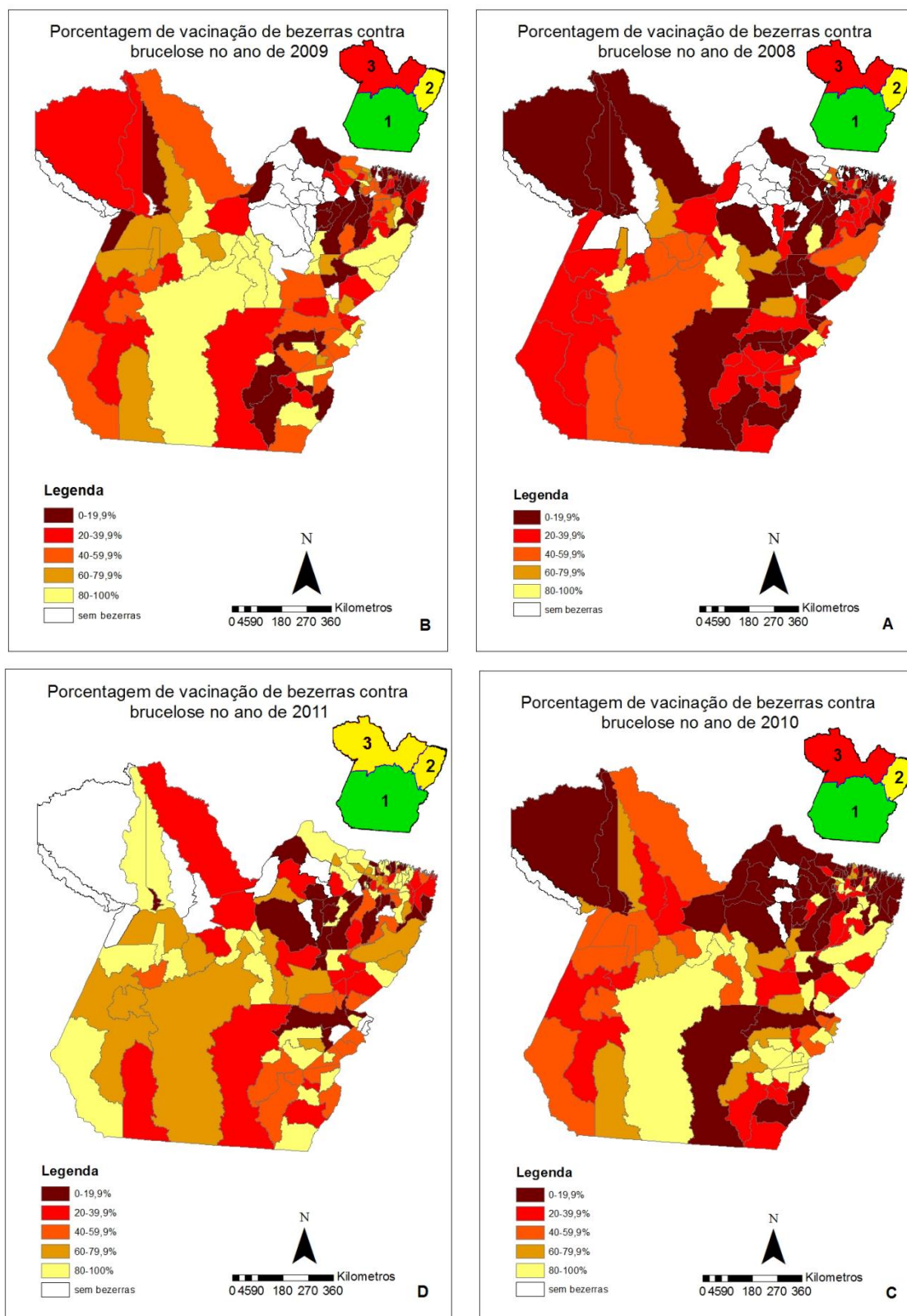


Figura 2. Taxa de vacinação de bezerras bovinas contra brucelose (vacina B19), no Estado do Pará, segundo o município, durante os anos de 2008 (A), 2009 (B), 2010 (C) e 2011 (D).

No último ano do período avaliado (2011) a área 3 já havia recebido *status* sanitário alterado para área de médio risco. Nessa área é possível observar (Fig. 2d) que houve alteração na distribuição dos municípios em relação à taxa de vacinação, além da alteração,

também, no número de municípios sem bezerras em idade de vacinação, comparado com os demais anos analisados.

A porcentagem de municípios da área livre com taxa de vacinação acima de 80% aumentou de 11,36% em 2008 para 58,3% em 2011, ou seja, apresentou aumento de 5,1 vezes. Na área que já era anteriormente classificada como médio risco (área 2) este aumento foi de oito vezes, aumentando de 3,92% para 31,3% dos municípios. A mudança mais notável foi em relação à área 3, na qual nenhum município atingiu 80% de cobertura em 2008 e que passou a apresentar 28% dos municípios com taxa de vacinação acima de 80%, em 2011.

Avaliando-se a totalidade do Estado observou-se durante o período avaliado, diminuição no número de municípios com taxas de vacinação entre 0 e 40% e o aumento daqueles com taxas acima de 41% (Tabela 5). A mudança mais importante foi para o número de municípios com taxas entre 81 e 100%, com aumento de seis vezes de 2008 (7) para 2011 (42).

Tabela 5. Número de municípios do Estado do Pará, segundo os índices de vacinação de bezerras bovinas contra brucelose utilizando a vacina B19, no período de 2008 a 2011. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

| Taxa de vacinação (%) | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|
| 0-20 | 51 | 42 | 58 | 21 |
| 21-40 | 37 | 27 | 26 | 19 |
| 41-60 | 13 | 21 | 21 | 25 |
| 61-80 | 7 | 18 | 13 | 19 |
| 81-100 | 7 | 21 | 21 | 42 |
| sem bezerras | 28 | 14 | 4 | 7 |
| Total | 143 | 143 | 143 | 133 |

Um fator a ser destacado, conforme ressaltaram Minervino et al. (15), é que a prática da vacinação do rebanho bovino contra brucelose é recente no Estado do Pará, tendo sido implantada como medida compulsória apenas a partir de janeiro de 2005 (6). Além disso, outros fatores podem ter contribuído para o aumento nos índices de vacinação, incluindo a contratação de maior número de fiscais agropecuários nos anos de 2008 e 2010 (os quais se empenharam na educação sanitária visando a conscientização dos proprietários sobre a importância da vacinação), a autorização para exportação de gado vivo da área livre a partir de 2010 e o pleito, em 2011, para a ampliação da área livre para todo o Estado, conforme ocorrido em 2013 (9).

Um reflexo deste aumento nas taxas de vacinação foi a redução da soroprevalência da brucelose em bovinos e bubalinos no Estado do Pará entre 2008 a 2012, de 4,58% para 1,30%, conforme demonstraram Casseb et al. (16), a partir dos resultados de exames realizados por médicos veterinários do serviço oficial de defesa sanitária animal, e por médicos veterinários autônomos habilitados pelo MAPA junto à ADEPARÁ.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram as regionais e os municípios com menores taxas de vacinação no Estado, possibilitando, a partir das características geográficas, climáticas e econômicas locais ou regionais, adotar medidas sanitárias que visem o incremento da vacinação como a elaboração de projetos educativos para a conscientização de produtores rurais de pequenas, médias e grandes propriedades sobre a importância do controle da doença por meio da vacinação e implantação de cursos de formação de agentes vacinadores semelhantes aos realizados no Estado da Bahia (17).

CONCLUSÃO

O presente estudo indica que o aumento na taxa de vacinação contra brucelose bovina no Estado do Pará, no período de 2008 a 2011, pode ter sido influenciado pela reestruturação das áreas de risco pelo PNFA, uma vez que houve diferença entre as taxas de vacinação nas três áreas delimitadas pelo PNEFA.

Infere-se, que, mesmo com a medida compulsória da comprovação de vacinação para a movimentação dos animais e mesmo diante da obrigatoriedade da vacinação das bezerras contra a brucelose, o Estado ainda tem a taxa média considerada abaixo do esperado para evolução para a fase de erradicação. No entanto, ressalta-se que foi marcante a melhora da cobertura vacinal neste período, indispensável para o controle da doença e de grande importância para a saúde do rebanho, para a economia e Saúde Pública Paraense.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sílvia Helena Venturoli Perri pela colaboração na análise estatística e à ADEPARÁ pela disponibilização dos dados.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DAS; 2006.
2. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary virology. San Diego: Academic Press; 1999.
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 50, de 24 de Setembro de 2013 [Internet]. Brasília: MAPA; 2013 [cited 2014 Dec 04]. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.
4. OIE - World Organization for Animal Health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014 [Internet]. Paris; 2014 [cited 2014 Jan 14]. Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>.
5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR), Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 44, de 02 de Outubro de 2007 [Internet]. Brasília: MAPA; 2007 [cited 2013 Dec 02]. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.
6. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Pará. Portaria ADEPARA nº 6, de 15 de Junho de 2004 [Internet]. Belém: ADEPARA; 2004 [cited 2013 Dec 02]. Available from: http://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-6-2004-pa_146675.html.

7. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR), Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 25, de 28 de Junho de 2007 [Internet]. Brasília: MAPA; 2007 [cited 2013 May 28]. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR), Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 06 de Outubro de 2010 [Internet]. Brasília: MAPA; 2010 [cited 2013 Nov 22]. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 16, de 16 de Junho de 2014 [Internet]. Brasília: MAPA; 2014 [cited 2014 Dec 04]. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de Dados. Estados@ [Internet]. Pará; 2013 [cited 2013 Dec 02]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pa>.
11. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BR). Dados de rebanho bovino e bubalino do Brasil - 2012. Brasília: MAPA; 2012 [cited 2013 Nov 22]. Available from: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil_2012.pdf.
12. SAS. Statistical Analysis System. SAS OnlineDoc®: version 8. Cary: SAS Institute; 1999.
13. Associação Brasileira dos Exportadores de Gado. As exportações de bovinos vivos no contexto da pecuária brasileira - 2012 [Internet]. Bebedouro: Scot Consultoria; 2012 [cited 2013 Nov 26]. Available from: http://www.scotconsultoria.com.br/cartas/120427_Exportacao_de_bovinos_no_contexto_da_pecuaria_def.pdf.
14. [Amaku M](#), Dias RA, [Ferreira Neto JS](#), [Ferreira F](#). Modelagem matemática do controle de brucelose bovina por vacinação. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2009;61 Supl 1:135-41.
15. Minervino AHH, Calhau AS, Alves Filho A, Barbosa RS, Neves KAL, Barros IO, et al. Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos sororeagentes à brucelose no estado do Pará. *Acta Vet Brasilica*. 2011;5(1):47-53.

16. Casseb AR, Cruz AV, Jesus IS, Silva SP, Negrão AM, Barros Neto S, et al. Soroprevalência da brucelose bovina e bubalina no Estado do Pará. *Vet Zootec.* 2015;22(1):42-5.
17. Agência de Defesa Agropecuária da Bahia. Curso de capacitação de agentes vacinadores para Brucelose [Internet]. Salvador: ADAB; 2013 [cited 2013 Dec 02]. Available from: http://www.adab.ba.gov.br/?page_id=5345.

Recebido em: 18/06/2015

Aceito em: 08/08/2016

SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR CANINE LEPTOSPIROSIS IN THE COAST OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL

Rodrigo Costa da Silva¹
Vanessa Yuri de Lima²
Aristeu Vieira da Silva³
Luiz Carlos de Souza⁴
Helio Langoni⁴

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide anthroponosis, mainly distributed in coastal and tropical regions, and caused by the bacterium *Leptospira* spp. In urban areas, synanthropic rodents are the main transmitters to humans and other animals through the urine. Dogs can participate as domestic reservoirs to the human infection due to the renal persistence and elimination of the bacterium through the urine. Thus, the present study aimed to determine the presence of antibodies to *Leptospira* spp. in serum samples from dogs in Ubatuba municipality, São Paulo State, Brazil. Associations between the serological results and epidemiological variables such as breed, age, sex, access to the street, access to untreated water, previous vaccination against leptospirosis, and presence of rodents, were assessed. *Leptospira* spp. antibodies were detected in 30/205 (14.6%) serum samples, and the prevalent serovars were Pyrogenes (30%), Autumnalis (23.3%), and Canicola (20%). No coagglutination was observed, as well as no significant association was observed between the studied epidemiological variables and the serology (p-value > 0.05). Thus, leptospirosis is active and circulating the studied city, which has high rainfall index; however, factors like access of dogs to the street, accumulated water and presence of rodents did not present the expected importance. Further studies should be conducted in the studied region focusing the detection of antibodies in stray dogs, which are more exposed to the bacterium in coastal and tropical areas, as well as live close to the production and herbivorous animals.

Keywords: *Leptospira* spp., dogs, antibodies, infection, public health, coast.

INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSE CANINA NO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO

A leptospirose é uma antropozoonose mundialmente distribuída, principalmente em regiões litorâneas e tropicais, e causada pela bactéria *Leptospira* spp. Em áreas urbanas, os roedores sinantrópicos são os principais transmissores aos seres humanos e outros animais pela urina. Os cães podem atuar como reservatórios domésticos para a infecção no homem devido a persistência renal da bactéria e eliminação pela urina. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a presença de anticorpos para *Leptospira* spp. em amostras de soro de cães do município de Ubatuba, SP, Brasil. As associações entre os resultados sorológicos e variáveis epidemiológicas como raça, idade, sexo, acesso a rua, acesso a água não tratada,

¹ PhD, Postdoctoral Associate. Department of Pathobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State.

² Escola de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica, Toledo, Paraná, Brasil

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil. Contato principal para correspondência.

⁴ Professor do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ-UNESP Univ. Estadual Paulista, Botucatu, SP.

vacinação prévia contra sorovares de *Leptospira* spp., e presença de roedores, foram analisadas. Anticorpos para *Leptospira* spp. foram detectados em 30/205 (14,6%) amostras de soro, e os sorovares prevalentes foram Pyrogenes (30%), Autumnalis (23,3%) e Canicola (20%). Nenhum sorovar co-aglutinante foi observado, e também não foi observada associação significativa entre as variáveis epidemiológicas estudadas e os resultados da sorologia ($p > 0,05$). Assim, conclui-se que a leptospirose está circulante no município estudado, município que apresenta alto índice pluviométrico, porém fatores como acesso de cães à rua, água acumulada e presença de roedores não apresentaram importância esperada. Futuros estudos devem ser realizados na região estudada focando a pesquisa de anticorpos também em cães errantes, que se encontram mais expostos à bactéria em áreas litorâneas e tropicais, e o convívio com animais herbívoros e de produção.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., cães, anticorpos, infecção, saúde pública, litoral.

ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEPTOSPIROSIS CANINA EN LA COSTA DEL ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMEN

La leptospirosis es una antropozoonosis distribuida por todo el mundo principalmente en las regiones costeras y tropicales, y es causada por la bacteria *Leptospira* spp. En las zonas urbanas, los roedores sinantrópicos son los principales transmisores a los seres humanos y otros animales por la orina. Perros pueden actuar como los principales reservorios domésticos para la infección en el hombre debido a la persistencia renal de la bacteria y la eliminación en la orina. Así, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de anticuerpos para *Leptospira* spp. en muestras de suero de perros de la ciudad de Ubatuba, SP, Brasil. Las asociaciones entre los resultados serológicos y variables epidemiológicas como la raza, edad, género, acceso a la calle, acceso al agua no tratada, vacunación previa contra *Leptospira* spp. y presencia de roedores fueron analizadas. Anticuerpos para *Leptospira* spp. fueron detectados en 30/205 (14,6%) muestras de suero, y los serovares prevalentes fueron Pyrogenes (30%), Autumnalis (23,3%) y Canicola (20%). No se observó serovar co-aglutinante, ni asociación significativa entre las variables epidemiológicas estudiadas y los resultados de la serología ($p > 0,05$). Así, concluyese que la leptospirosis está circulante en el municipio estudiado, municipio que presenta alta precipitación, pero factores como el acceso a los perros de la calle, agua acumulada y presencia de roedores no se mostraron importantes como esperado. Futuros estudios deben ser realizados en la región estudiada, centrándose también en la pesquisa de anticuerpos en perros callejeros, los cuales están más expuestos a la bacteria en las zonas costeras y tropicales, y que viven junto con los animales herbívoros y de producción.

Palabras clave: *Leptospira* spp., perros, anticuerpos, infección, salud pública, costa.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide anthroponosis, caused by the bacterium, spirochete, *Leptospira* spp. that affects several wild and domestic animal species, and humans (1,2). This infection presents a high social, economical and cultural importance. It is spread by factors like disordered growth of urban centers, migrations, deficiencies in basic sanitary conditions, high rainfall indexes, and uncontrolled garbage accumulation. The persistence of the agent in the nature and its high infectious potential rate are assured by different serovars, multiple host species and relative degree of survival in the environment (3,4). The environmental resistance

increases the importance of animals considered healthy carriers, which can excrete leptospira and are the major responsible for the persistence of the disease foci, responsables for the maintenance of the agent in the environment (1). In this context, dogs have great importance in the epidemiology of leptospirosis due to their close relationship o the humans (5,6). Dogs eliminate some serovars through the urine, intermittently, for months and years. Rodents, specially *Rattus norvegicus* (*R. norvegicus*), are the main reservoirs of the serovar Icterohaemorrhagiae (6,7). *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae and serovar Canicola are the most common serovars isolated from dogs with leptospirosis (4,5,8-10).

Leptospirosis can be transmitted among the animals by direct contact, venereal and placentar transmission, and wounds. Indirect transmission occurs by the exposure of susceptible animals to contaminated vegetation, soil, food and water, as well as fomites (1).

In this way, the present study aimed to determine the frequency of antibodies to *Leptospira* spp. in dogs from Ubatuba, a coastal municipality in São Paulo State characterized by a high rainfall index in the tropical region of Brazil, as well as the most frequent epidemiological variables associated to the occurrence of the infections in the studied population.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and sampling

This study was carried out in Ubatuba, a coastal municipality located in the north of the São Paulo State (23°26'S; 45°04'W), Southeastern region of Brazil. Ubatuba is crossed by the Tropic of Capricorn (11) and presents rainfall index ranging approximately from 1,600 to 3,000 mm/year (12); it is located at 250 km away from the capital of the State, and surrounded by "Serra do Mar" and Atlantic Forest (712 Km² total area), and mean altitude of 835 m above the sea level, with a range from 800 to 1670 m in the highest parts. The climate is humid tropical, and present dominant winds from the South and Southeast. The population is estimated in 78,801 habitants (13) (105.33 inhabitants/km²). The urbanization rate is 97.8%, with 22.8% receiving sanitary treatment and 76.2% treated water.

This study was designed as a cross-sectional study. The sample size was determined considering a human population from the studied city, obtained with the Brazilian government by the Censo 2010, and using a 1:10 (dog:man) proportion (14), which resulted in 7,501 dogs. Considering a prevalence of 50%, standard-error of 7%, the minimum number of animals calculated was 191, but increased to 205 due to the availability and safety reasons (15). Sample size was calculated in EpiInfo 3.1 (16). All animals had an owner, and they were randomly selected with no preferences for indoor or stray dogs, sex, age or breed. All dog owners signed a consent and authorization term for the utilization of samples in this research. Blood samples (4-5 mL) were drawn by cephalic or jugular vein puncture, and serum samples obtained by the centrifugation at 1,600 x g, 10 min. Serum samples were transferred to microtubes, and stored at -20°C.

Questionnaire

An epidemiological questionnaire was applied to the owners or those who fed the animals used in this study. It was directed to the risk factors related to the leptospirosis. The collected data included breed, age, sex, access to the street, previous vaccination against *Leptospira* spp. serovars, access to untreated water (both in the house and on the street), and presence of rodents in the house and surrounding areas.

Microscopic agglutination test (MAT)

Serum samples were tested for *Leptospira* spp. antibodies using the microscopic agglutination test (MAT) (17). A panel of 25 serovars were tested and represented ten *Leptospira* spp. serogroups, as follows: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Djasiman, Sentot, Gryppotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Andamana, and Patoc. Samples were two-ratio diluted, starting at 1:100. The titer was considered the reciprocal of the highest dilution with less than 50% leptospira agglutination. The cut-off titer was considered as 100.

Statistical analysis

All data were entered in a Excel spreadsheet. The association between the epidemiological variables and the serological results for *Leptospira* spp. antibodies was assessed using the Chi-square (χ^2), or Fisher's exact test, considering $\alpha = 0.05$. All tests were run using InStat 3 (GraphPad Software, USA).

RESULTS

Leptospira spp. antibodies were detected in 30/205 (14.6%; CI95% 10.5-20.1%) canine serum samples, with higher occurrence in animals living close to beach areas. The prevalent serovars were Pyrogenes, Autumnalis and Canicola (Table 1). No coagglutination was observed. None of the positive animals had been previously vaccinated against *Leptospira* spp. serovars according to the questionnaire. Also, no significant association was observed between the serology and the studied epidemiological variables (p-value > 0.05) (Table 2).

Table 1. Frequency of *Leptospira* spp. serovars in 205 studied dogs.

| Serovar | Positive samples | Percentage (%) | CI95% ^a |
|---------------------|------------------|----------------|--------------------|
| Pyrogenes | 9 | 30.0 | 16.7-48.0 |
| Autumnalis | 7 | 23.3 | 11.9-41.1 |
| Canicola | 6 | 20.0 | 9.6-37.5 |
| Copenhageni | 4 | 13.3 | 5.4-29.8 |
| Icterohaemorrhagiae | 2 | 06.7 | 2.0-21.4 |
| Grypottyphosa | 2 | 06.7 | 2.0-21.4 |
| Total | 30 | 100.0 | - |

^a CI95%: 95% confidence interval.

Table 2. Univariate analysis for the association between the epidemiological variables and serological results for leptospirosis.

| Variables | | N | MAT ^a | Reagent; CI95% ^b | OR (CI95%) ^c | p-value ^d |
|---------------------------|--------|-----|------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Sex | Male | 95 | 13 | 13.7; 08.2–22.0 | 0.9 (0.4–1.9) | 0.44 ^f |
| | Female | 110 | 17 | 15.4; 09.9–23.4 | | |
| Breed | DEF | 34 | 3 | 8.8; 03.2–23.1 | 0.5 (0.2–1.8) | 0.22 ^f |
| | UDF | 171 | 27 | 15.8; 11.1–22.0 | | |
| Age (years) | 0-4 | 80 | 9 | 11.2; 06.1–20.0 | - | 0.13 ^e |
| | 4-8 | 73 | 9 | 12.3; 06.7–21.8 | | |
| | 8-12 | 52 | 12 | 23.1; 13.8–36.2 | | |
| Access to the street | Yes | 84 | 8 | 9.5; 05.0–17.7 | 0.5 (0.2–1.1) | 0.06 ^f |
| | No | 121 | 22 | 18.2; 12.3–26.0 | | |
| Access to untreated water | Yes | 77 | 8 | 10.4; 05.4–19.2 | 0.6 (0.2–1.3) | 0.13 ^f |
| | No | 128 | 22 | 17.2; 11.6–24.7 | | |
| Vaccination | Yes | 77 | 0 | 00.0; 00.0–00.2 | - | 0.07 ^f |
| | No | 128 | 30 | 15.9; 11.4–21.8 | | |
| Presence of rodents | Yes | 80 | 11 | 13.8; 07.9–23.0 | 0.9 (0.4–2.0) | 0.47 ^f |
| | No | 125 | 19 | 15.2; 10.0–22.5 | | |

Legend: DEF, defined breed; UDF, undefined breed; ^a Titer ≥ 100 ; ^b Frequency of positive animals based on the studied variable; ^c OR (CI95%): Odds ratio (95% confidence interval) ^d p-value to $\alpha = 5\%$; ^e Chi-Square test (χ^2); ^f Fisher's exact test.

DISCUSSION

Leptospirosis is a important disease, mainly in tropical areas, and dogs may develop an important role on the maintenance of the infection. This study reports an infection occurrence of 14.6% in dogs, which quite similar to the observed in other canine populations sampled in Brazil and other countries around the world, ranging from 2.7 to 28.9% (4,8-10,18-23), dependent on the social and economic factors, as well as the climate of each area. For example, Blazius et al. (9) observed 10.5% (62/590) reagent dogs in another part of the Brazilian coast. The tropical and subtropical conditions reported by Blazius et al. (9) and this study suggest that the climate in both areas allowed the maintenance of the bacterium, mainly by the presence of dogs and rodents, which keep the causative agent in the nature.

Dogs play an important role in the transmission of this disease to the humans. They keep the bacterium in their kidneys for long periods, and can eliminate it intermittently through the urine without presenting clinical signs, or even after clinical improvement. This is a serious problem due to their domestic habits and close contact to the owners and other humans (1,19), which allows the dissemination of the infection to the humans and other animal species. Stray dogs, or even those spending most of time out of their houses, are longer exposed to infectious *Leptospira* spp. specimens present in the environment, eliminated by other infected dogs, and constitute the major infection sources to humans (9,18).

Rats, *R. norvegicus*, are the main carriers of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae and, once infected can transmit this and other serovars intermittently during their life, without any clinical sign or death (1,2). This serovar has been frequently observed in tropical regions, i.e. São Paulo City (6). However, the present study observed low frequency for this serovar (2/30; 6.7%), and, as the others, no significant association with the presence of rodents. On the other hand, the answer to the questionnaire can be masked since rodents have nocturnal habits and might have not been seen even inside the house and surrounding areas. No significant association was neither observed to other important related variables to leptospirosis, i.e., access to the street. It is different from the observed by Silva et al. (21), in Botucatu City, SP, a non-coastal region, who detected significant association of 22.1% positive dogs with the access to the street.

Serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae are considered the most frequent cause of canine leptospirosis in the USA. However, in these days, Grippotyphosa, Pomona and Bratislava are considered very important for dogs, not only in North America but also in South America, Africa, Europe and Asia (7,24). [Birnbaum et al. \(25\)](#) detected 91.2% (31/34) dogs infected with *L. interrogans* serovar Pomona or Grippotyphosa, presenting renal and hepatic disease in New York, USA. [Okewole and Ayoola \(23\)](#) observed 64.7% (11/38) dogs positive to Grippotyphosa in Nigeria. [Nielsen et al. \(26\)](#), [Van den Broek et al. \(27\)](#), [Stokes et al. \(10\)](#) and [Okewole and Ayoola \(23\)](#) observed that, in addition to the others, Bratislava is also important in the USA, United Kingdom and Nigeria.

As shown in Table 1, Pyrogenes (9/30; 30.3%), Autumnalis (7/30; 23.3%) and Canicola (6/30; 20%) are the main causative serovars in the studied region of the Brazilian coast. Similar results were obtained by [Blazius et al. \(9\)](#), who detected Pyrogenes (26/62; 18%), Canicola (20/62; 13.8%), and Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (18/62; 12.5%) in dogs from Itapema, a coastal region from Santa Catarina State, South Region of Brazil.

However, [Aguiar et al. \(22\)](#) detected Autumnalis (20/90; 22.2%) as the prevalent serovar in Monte Negro, RO, North Region of Brazil, followed by Pyrogenes (11/90; 12.2%), Canicola (9/90; 10%), and Shermani (7/90; 7.5%). Similar results were observed by [Mascoll et al. \(4\)](#) with Autumnalis (34.8%), Copenhageni (24%) and Icterohaemorrhagiae (10.3%), as well as by [Silva et al. \(28\)](#) with Castellonis (28.68%), Autumnalis (19.12%), and Pyrogenes (17.65%).

In other hand, [Yasuda et al. \(18\)](#) observed Canicola as the prevalent one (50.7%). Canicola is the most frequent serovar in dogs, and causes important infection in humans. In dogs, it may cause acute disease, fever (40°C), difficulty to move the posterior members, apathy, anorexia, pain to abdominal and posterior member palpation, bloody diarrhea, yellowish vomits, bloody salivation, and necrosis of the tongue edges (3,5,7,9,10,17,19,21).

Serovar Pyrogenes is the most common among production and herbivorous animals (cattle, horses, sheep and goats), as well as and other species co-habiting the same places. Therefore, this serovar commonly occurs in rural environments and is considered accidental to dogs (8). Accidental hosts are not important infection reservoirs, and the transmission occurrence is low. The transmission from an accidental host is relatively rare (8). To the epidemiological point of view, accidental hosts work much better as sentinels for the infection in humans and dogs. In this study, the infection by Pyrogenes has probably occurred because most of dogs and herbivores (mainly horses) share the same area the live in this region.

No significant association was observed between the epidemiological variables and the serological results (p-value > 0.05). In other hand, [Aguiar et al. \(22\)](#) observed significant association to the sex, in which males had 2.3 more chances to have positive results to the serology than females (CI95% = 1.3-3.9; p-value < 0.05). The high occurrence in males was also reported by [Modolo et al. \(20\)](#), with 18.4% infected males, compared to 11% females (p-value < 0.05).

In the studied region, leptospirosis has a seasonal character since the rainfall index is high throughout the year, which is different from Itapema (9), where rainfall index is higher from December to January with consequent increase of the incidence (2,7). This constitutes an alert for both public health offices and the population to improve the control of such animals. Contaminated water is the main responsible for the dissemination of leptospirosis by the direct contact (8); however, in this study it did not present the expected importance in the transmission to dogs.

Maintenance hosts are generally wild species and, sometimes, pets or production animals. The transmission among these hosts is efficient and the incidence is relatively high. The contact with maintenance hosts or areas contaminated with their urine may disseminate the infection (8).

The present study highlight the circulating *Leptospira* spp. in the studied Brazilian coastal region, but the studied risk factors did not present the expected importance for the transmission and maintainance of the infection, which contributes to the keep dogs as sources of infection to the humans. Further studies should be conducted in the studied region focusing the detection of antibodies in stray dogs, which are more exposed to the bacterium in coastal and tropical areas, as well as live close to the production and herbivorous animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank all the students of the Discipline Epidemiology and Sanitation, Graduate Program in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University-UNESP, who helped in blood sampling. The authors also thank to Ubatuba Municipal Council and UNESP for logistical support.

REFERENCES

1. Greene CE. Clinical microbiology and infection diseases of the dog and the cat. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006. 1376 p.
2. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles communes al hombre y a los animals. 3rd ed. Geneva: Organización Panamericana de la Salud; 2003. 443 p.
3. Corrêa MOA, Veronesi R, Brito T, Hyakutake S, Santa Rosa CA, Edelweiss EL. Leptospiroses. In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p.573-89.
4. Masculli R, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Ferreira F, Morais ZM, Pinto CO, et al. A dog serologic study of leptospirosis in the city of Santana de Parnaíba, State of São Paulo, during the 1999 rabies vaccination campaign. *Arq Inst Biol.* 2002;69(2):25-32.
5. Brod CS, Aleixo JA, Jouglard SD, Fernandes CP, Teixeira JL, Dellagostin OA. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(4):294-300.
6. Chapola EG, dos Santos MG, Bessa TA, de Oliveira ML. Human and canine leptospirosis: serological data of Sao Paulo City, Brazil, 2000 to 2003. *Rev Cuba Med Trop.* 2005;57(1):61-2.
7. Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1996;11(3):166-71.
8. Jouglard SDD, Brod CS. Leptospirosis in dogs: prevalence and the risk factors in the rural area of Pelotas, RS. *Arq Inst Biol.* 2000;67(2):181-5.
9. Blazius RD, Romao PR, Blazius EM, da Silva OS. Occurrence of *Leptospira* spp. soropositive stray dogs in Itapema, Santa Catarina, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005;21(6):1952-6.
10. Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, et al. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;230(11):1657-64.

11. Instituto Nacional de Meteorologia. Relatório sobre variação média mensal de temperatura e pluvimetria entre 1994 e 2003, no município de Ubatuba. Ubatuba: INM; 2005.
12. Governo do Estado de São Paulo. Programa Estadual dos Recursos Hídricos 2004-2007 [Internet]. São Paulo: PERH; 2008 [cited 2008 Jan 29]. UGRHI 03 Litoral Norte. Available from: http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/PERH/04-07_UGRHI-03.pdf.
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2016 [cited 2016 Maio 4]. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=35&search=sao-paulo>.
14. Reichmann MLAB, Pinto HBF, Nunes VFP. Vacinação contra raiva de cães e gatos. São Paulo: Instituto Pasteur; 1999.
15. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. London: Blackwell Science Ltd; 1995.
16. Center for Disease Control and Prevention. Epi Info: version 3.5.4. Atlanta: CDC; 2002.
17. Ministério da Saúde (BR). Manual de leptospirose. 2a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. p.98.
18. Yasuda PH, Santa Rosa CA, Yanaguita RM. Seasonal variation in the prevalence of leptospirosis in stray dogs in Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*. 1980;14(4):589-96.
19. Magalhães DF, Silva JA, Moreira EC, Wilke VML, Haddad JPA, Meneses JNC. Prevalence of anti-*Leptospira interrogans* agglutinins in dogs from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2001 – 2002. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58(2):167-74.
20. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Victoria C, et al. Seroepidemiological inquiry of canine leptospirosis in the urban area from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2006;43(5):598-604.
21. Silva WB, Simões LB, Lopes ALS, Padovani CR, Langoni H, Modolo JR. Risk factor evaluation and spatial distribution analysis for urban dogs serum reactive to *Leptospira* spp. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2006;43(6):783-92.
22. Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vasconcellos SA, et al. Risk factors associated with anti-*Leptospira* spp antibodies occurrence in dogs from Monte Negro County, Rondônia, Brazilian Western Amazon. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(1):70-6.
23. Okewole EA, Ayoola MO. Seroprevalence of leptospiral serovars other than *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae* in dogs in the Southwestern Nigeria. *Vet Arhiv*. 2009;79(1):87-96.
24. Jamshidi S, Vandeussefi GM, Dezfoulia O, Ghaffari MS. Isolation of *Leptospira Canicola* from a dog in Iran: first report. *Iran J Vet Res*. 2008;9(3):291-4.

25. Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract.* 1998;39(5):231-6.
26. Nielsen JN, Cochran GK, Cassells JA, Hanson LE. *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection in two dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(3):351-2.
27. Van den Broek AHM, Thrusfield MV, Dobbie GR, Ellisi WA. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. *J Small Anim Pract.* 1991;32(3):118-24.
28. Silva WB, Simões LB, Padovani CR, Langoni H, Lopes ALS, Modolo JR. Serological inquiry and spatial distribution to canine leptospirosis in urban territorial area of the city of Botucatu, São Paulo. *Vet Zootec.* 2009;16(4):656-68.

Recebido em: 28/06/2015

Aceito em: 08/07/2016

LONG BONE FRACTURES IN CATS: A RETROSPECTIVE STUDY

Catarina Borges Cardoso¹
Sheila Canevese Rahal²
Felipe S. Agostinho¹
Maria Jaqueline Mamprim³
Rogério R. Santos²
Ednaldo S. Filho⁴
Ana Carolina Mortari⁵
Frederico O. B Monteiro⁴

ABSTRACT

The aim of this study was to retrospectively assess a population of cats with long-bone fractures over a six year period. Data about cat signalment (breed, sex, age, body weight); domiciled or not; cause of injury; time of occurrence; injured limbs and fractured bones (humerus, radius/ulna, femur, tibia/fibula); soft-tissue damage (closed, open); and fracture location (proximal, middle or distal one-third), direction of the fracture line in relation to the bone's longitudinal axis (transverse, oblique, spiral) and extent of damage (incomplete, complete, multi-fragmentary) were evaluated. To compare the variable proportions was used G-test assumed that the proportions in each category were equal. The differences were considered significant at $p < 0.05$. A total of 141 cats were evaluated, 90.07% were crossbreed, 6.38% Siamese, and 3.55% Persian. The body weight was greater than or equal to 2.0 kg in 68.08% of the cases. The femur was the most affected bone (50.84%), followed by the tibia/fibula (29.05%), and radius/ulna (10.61%) and humerus (9.50%). The cats had from six to 180 months of age, being 58.16% up to 12-month-old. Motor vehicle accidents accounted for 42.55% of the causes, followed by dog bites (12.76 %), falls (4.25%), and accidents in general. The closed fractures (85.47%) were more frequent than open fractures (11.12%). In conclusion, this population was constituted mainly of domiciled crossbred cats, under 12 months of age, weighing more than or equal to 2.kg, that have been more frequently affected by complete and closed fractures of the femur due to traffic-related accident.

Keywords: feline, fracture, cause, classification.

FRATURAS DE OSSOS LONGOS EM GATOS: ESTUDO RETROSPECTIVO**RESUMO**

O trabalho teve por objetivos analisar, retrospectivamente, uma determinada população de gatos com fraturas dos ossos longos, por um período de oito anos. Foram pesquisados dados sobre a identificação do animal (raça, sexo, idade, peso); se domiciliado ou não; causa da lesão; tempo da ocorrência; membros (torácico e/ou pélvico) e ossos acometidos (úmero, rádio/ulna, fêmur, tíbia/fíbula); comprometimento de partes moles (fechada, exposta); e tipo

¹ Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP. catarinaborges.vet@gmail.com

² Professora do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP
sheilacr@fmvz.unesp.br

³ Professora do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
jaquelinem@fmvz.unesp.br

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém do Pará, Brasil. Avenida Tancredo Neves, 2501 – Terra Firme CEP: 66.077-580. silva.filho@ufra.edu.br.

⁵ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF, CEP 70910-900. acmortari@unb.br

de fratura quanto à região (terço proximal, médio e distal), orientação da linha de fratura relativa ao eixo ósseo (transversa, oblíqua, espiral) e extensão do dano (incompleta, completa, multifragmentar). Para comparar as proporções das variáveis avaliadas foi usado teste G assumindo proporções esperadas iguais. O limite de significância estatística foi $p < 0,05$. Um total de 188 gatos foi avaliado, sendo 89,33% sem raça definida, 5,85% da raça Siamês e 4,78% da raça Persa. A idade dos gatos variou de 6 a 180 meses, sendo 60,63% até 12 meses de idade. O peso corpóreo foi maior ou igual a 2,0 kg em 68,08% dos casos. Entre as causas: 40,95% por acidentes por veículos motorizados, seguido por mordidas (9,04%), quedas (4,78%), e acidentes em geral (5,31%). O fêmur foi o osso mais afetado (53,81%), seguido pela tibia/fíbula (28,38%), e rádio/ulna (9,74%) e úmero (8,05%). As fraturas fechadas (84,74%) foram a mais frequentes que as expostas (11,44%). Baseado nos dados obtidos foi possível concluir que a população estudada constitui-se principalmente de gatos domiciliados, sem raça definida, com menos de 12 meses de idade, peso maior ou igual a 2,0 kg e que são mais frequentemente acometidos por fraturas fechadas e completas do fêmur devido ao atropelamento.

Palavras-chave: felino, fratura, causa, classificação.

FRACTURAS DE LOS HUESOS LARGOS EN LOS GATOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue analizar, de forma retrospectiva, una población de gatos con fracturas de huesos largos en un período de seis años. Los datos significativos del gato (raza, sexo, edad, peso corporal); domiciliados o no, causa de lesión, el tiempo de ocurrencia; extremidades lesionadas y los huesos fracturados (húmero, radio/cúbito, fémur, tibia/peroné), el daño de los tejidos blandos (cerrado, abierto), y localización de la fractura (proximal, medio y distal tercero), la dirección de la línea de fractura en relación al eje del hueso longitudinal (transversal, oblicua, espiral) y el alcance de los daños (incompleto, completo, multi - fragmentaria) fueron evaluados. La prueba para comparar las proporciones variables que se utilizó, supone que las proporciones de cada categoría fueron iguales. Se consideraron valores significativos de $p < 0,05$ las diferencias. En conclusión, esta población estuvo constituida principalmente de gatos mestizos domiciliados, de menos de 12 meses de edad, de peso superior o igual a 2.kg, que han sido más frecuentemente afectados por fracturas completas y cerradas de fémur a causa de accidentes de tráfico.

Palabras clave: felino, fratura, causas, clasificación.

INTRODUCTION

Most of the long bone fractures in small animals take place in the hind limbs, and femur bone is the most commonly injured (1-7). This may be associated to survival ability, since traumas located to the caudal half of the body would be less likely to be fatal, or sense of self-defense, the animal put the hindquarters to absorb the major impact force in a situation of imminent trauma (2).

Depending on loading forces that the bone is submitted, such as compression, bending, tension, or torsion, will occur distinctive fracture patterns (8, 9). In addition, the rate of force application influences the type of fracture and the degree of soft tissue injury (9). There are various fracture classification systems including cause, anatomical location, morphology,

severity, whether or not the broken bone is exposed to the external environment, extent of bone injury, reducibility, stability, among others (3-5, 7, 10).

Fractures in cats exhibit some similarities with fractures in dogs, but anatomical differences need to be considered, such as humerus and femur straighter, supracondylar foramen in the humerus in which brachial vessels and median nerve pass, presence of clavicle (6, 11), which may reflect treatment approach. Furthermore, the type and severity of the fracture may be associated with the environment to which the animal is exposed (12).

Therefore, the aim of this study was to analyze a population of cats with long-bone fractures. The hypothesis was that characterization of the prevalence and types of lesions may contribute to understanding of disease and its prevention and treatment.

MATERIAL AND METHODS

Data from cats with long bone fractures treated at the Veterinary Hospital of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP Botucatu, Brazil, were analyzed retrospectively for a period of six years (2006 to 2011).

Data about cat signalment (breed, sex, entire or castrated, age, body weight); domiciled or not; cause of injury; time of occurrence; injured limbs (forelimb or hind limb) and fractured bones (humerus, radius/ulna, femur, tibia/fibula); soft-tissue damage (closed, open); and fracture location (proximal, middle or distal one-third), direction of the fracture line in relation to the bone's longitudinal axis (transverse, oblique, spiral) and extent of damage (incomplete, complete, multi-fragmentary) were evaluated.

To compare the variable proportions was used G-test assumed that the proportions in each category were equal. Data without information were excluded from the analysis. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 141 cats were evaluated in the present study, 90.07% ($n=127$) were crossbreed, 6.38% ($n=9$) Siamese and 3.55% ($n=5$) Persian. The high number of crossbred cats probably is associated with limited financial resources as well as preference of the owners. About sex, 57.45% ($n=81$) were males, 41.84% ($n=59$) females ($p=0.062$), and 0.71% ($n=1$) there was no information. Regarding age, the fractures were observed in cats from six to 180 months of age (mean, 18.1 months; approximately 1.5 years), being 58.16% ($n=82$) detected in animals up to 12 months of age, and 31.20% ($n=44$) over 12 months of age ($p < 0.001$). In 9.93% ($n=15$) of cases the age was not mentioned. In a survey of 109 bone fractures in cats was also observed absence of sex-associated prevalence, but 75% of patients had two years of age or younger age at time of fracture occurrence (1), age range different of the determined for the present study. In turn, in a study of 298 fractures in domestic cats was observed that 80% occurred in animals less than 3 years, with greater representation of males (13).

The body weight of the cats ranged from 0.3 kg to 6.3 kg (mean of 2.75 kg), and 68.08% ($n=96$) had body weight greater than or equal to 2.0 kg, 27.66% ($n=39$) had lower body weight than 2 kg ($p < 0.001$), and 4.25% ($n=6$) of cases there was no information. The entire cats were 38.30% ($n=54$) and castrated accounted for 11.35% ($n=16$) of the total ($p < 0.001$), but in 50.35% ($n=7$) of medical records this information was not reported. In general, heavier and neutered adult male cats are more prone to have spontaneous femoral capital physal fractures (14). Early neutering may induce delayed closure of the growth plate, especially in growth plates that close later (6, 7). Since apparently most of the cats in the present study were entire this may have reflected for the absence of this type of fracture.

The causes of fractures in cats are varied, but the most common causes are accidents by cars or other types of motorized vehicles, or falls from high places (3-4, 10). There are also those associated with bone destruction or bone weakness including neoplastic diseases, nutritional or metabolic disorders; by indirect violence and repetitive stress; or spontaneous fractures (3-4, 15). In the present study, motor vehicle accidents accounted for 42.55% (n=60) of the causes, followed by dog bites (12.76 %, n=18), falls (4.25 %, n= 6), and accidents in general (6.38 %, n=9) ($p<0.001$). However, the owner was unable to determine a cause in 34.04% of the cases (n=48). In addition, the patient's environment should be considered in determining why a fracture occurs (16). In this study, the majority were domiciled cats (72.34%, n=102), 7.09% (n=10) stray cats ($p<0.001$), and 20.57% (n=29) there was no information. Thus, the fractures probably occurred during the time that the cats roam or escape outdoors. Young cats have a higher tendency to roam outdoors, and are less accustomed to the environment and traffic, which favor traumatic fractures (12).

One hundred and forty-three fractures (79.89%) fractures occurred in the hind limbs ($p<0.001$) being the femur (63.64 %, n=91) the most affected bone, followed by the tibia/fibula (36.36%, n=52) ($p=0.001$). In turn, 20.11% (n=36) of the fractures occurred in the forelimbs, 52.78% (n=19) in the radius/ulna and 47.22% (n=17) in the humerus without statistical differences between bones ($p=7.739$). Concerning both forelimbs and hind limbs, femur (50.84%, n=91) was the most affected bone, followed by the tibia/fibula (29.05%, n=52), and radius/ulna (10.61%, n=19) and humerus (9.50%, n=17). Other population studies in cats have also found the femur as the most frequently fractured bone, but there were variations in the prevalence of fractures among tibia/fibula, humerus and radius/ulna (1, 11, 13, 17). Some authors consider fractures of the radius/ulna to be infrequent accounting for 3% of all bone fractures in cats, while humeral fractures represent approximately 5% (18).

The closed fractures are characterized by no puncture or open wound in the skin, while open fractures there is communication with the external environment (3, 10). Open fractures may be presented with varying degrees of soft tissue damage (9, 10) and are apparently more common in cats than in dogs (7). In the present study closed fractures (85.47%, n=153) were more frequent than open fractures (11.12%, n=20) ($p<0.001$), and 3.35% (n=6) cases there was no information. Open fractures are observed more frequently in bones below the elbow and stifle due to poor soft-tissue coverage (7, 19). Likewise, in the present study the bones most often associated with open fractures were tibia/fibula (70%, n=14). However, the second was the femur (n=6, 30%), probably related to severity of the injury. The interval between the injury and the time of treatment is very important in open fractures, because these fractures are predisposed to bacterial contamination and infection (19). In this study, this interval ranged from 1 hour to 720 hours (mean of 71.79 hours or approximately 3 days). Thus, the data indicate that the owners must be clarified about the risks of this delay in treatment.

Based on the extent of damage the fractures may be classified as complete if occurs complete disruption of the bone continuity, incomplete if has partial disruption of the bone, and multifragmental if one or more fragments are completely separated (3, 10). Salter-Harris are fractures that occur through growth plate of immature animals (5, 10), and these fractures have risk of premature physal closure and potential development of a bone deformity (5, 7). In the present study, 67.03% of the diaphyseal femur fractures were complete (n=61), 8.79% (n=8) multifragmental, and 2.20% (n=2) incomplete ($p<0.001$). Based on fracture line orientation relative to the long axis of the bone, 45.90% (n=28) of the complete femur fractures were transverse, 32.79% (n=20) diagonal, and 21.31% (n=13) spiral ($p=0.06$). In addition, 21.98% (n=20) were growth plate fractures. The tibia/fibula fractures were in 73.08% (n=38) complete, 11.54% (n=6) incomplete, and 1.92% (n=1) multifragmental ($p<0.001$). Of these tibia/fibula fractures 47.368 % (n=18) were transverse, 42.10% (n=16) oblique, 10.53% (n=4) spiral ($p=0.004$), and 13.46% (n=7) were considered physal.

In the forelimbs, 82.35% of the humeral shaft fractures were complete (n= 14), 5.88 % (n=1) incomplete, and 5.88 % (n=1) multifragmental (p<0.001). Based on fracture line orientation, 42.86 % (n=6) were transverse, 42.86 % (n=6) oblique, and 14.28% (n=2) spiral (p=0.267). One fracture was considered physeal (5.88%). The radius/ulna fractures were in 63.16% (n=12) complete, and 15.79% (n=3) multifragmental (p=0.001). Of these radius/ulna fractures 50% were transverse (n=6) and 50% oblique (n=6) (p=0.7697). In addition, 21.05% (n = 4) were growth plate fractures.

Thus, in this study the pattern of the majority of the fractures was complete, and transverse orientation was more common in tibia/fibula and radius/ulna fractures. Since the cats have ability to pronation and supination of the antebrachium and paw, this should be considered in the treatment choice in the radius/ulna fractures (18). Depending on localization in the bone, the fractures can be classified into proximal, shaft and distal zones (3). The diaphysis of the femur (56%) is the most common site of fracture in cats, followed by physeal fractures (20%) (18). However, in the present study 42.86 % (n=39) of the femoral fractures occurred in proximal, 25.27% (n=23) in middle, and 31.87% (n=29) in distal (p=0.059) third of the bone. In tibia/fibula was observed that 7.69% (n=4) of the fractures were located in the proximal third, 25% (n=13) in the middle third, and 67.31 % (n=35) in the third distal (p<0.001) that increasing the incidence of open fractures. Some authors have reported that most fractures of the humerus, as well as radius, preferably involving the middle and distal one-thirds of these bones (11, 17). However, in the present study 17.65% (n=3) of the humeral fractures occurred in proximal, 47.06% (n=8) in middle, and 35.29% (n=6) in the distal thirds (p=0.152), and 36.84% (n=7) of the radius/ulna fractures were located in proximal, 21.05% (n=4) in middle, and 42.10% (n=8) in distal thirds (p=0.241).

It was possible to conclude that the population evaluated in this study was constituted mainly of domiciled crossbred cats, under 12 months of age, weighing more than or equal to 2.0 kg, that have been more frequently affected by complete and closed fractures of the femur due to traffic-related accident.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for financial support (PIBIC and PQ 302826/2009-2), and the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) - PROCAD-NF No. 21/2009.

REFERENCES

1. Hill F.W.G. A survey of bone fractures in the cat. 1977. *J. Small Anim. Pract.* 18:457-463.
2. Harasen G. Common long bone fractures in small animal practice — Part 1. 2003. *Can. Vet. J.* 44:333-334.
3. Piermattei D.L., FLO G. & DeCamp C. 2006. Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 4 ed. Saunders, Philadelphia. 818p.
4. Scott H.W. & McLaughlin R. 2007. Introduction to feline orthopedic surgery, p.9-16. In: *Ibid.* (Eds). *Feline orthopedics*. Manson Publishing, London. 384p.
5. Scott H.W. & McLaughlin R. 2007. Fracture classification, decision making, and bone healing, p.43-49. In: *Ibid.* (Eds). *Feline orthopedics*. Manson Publishing, London. 384p.

6. Harasen G. Feline orthopedics. 2009. *Can. Vet. J.* 50:669-670.
7. Voss K. & Montavon P.M. 2009. Fractures, p.129-151. In: Montavon P.M., Voss K. & Langley-Hobbs S.J. (Ed.), *Feline orthopedic surgery and musculoskeletal disease*. Mosby Elsevier, Edinburgh. 582p.
8. Hulse D.A. & Hyman W. 1995. Practical biomechanics, p.57-73. In: Olmstead M.L. (Ed.), *Small animal orthopedics*. Mosby, St. Louis. 591p.
9. Johnson A.L. 2007. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management, p.930-1014. In: Fossum T.W. (Ed.), *Small animal surgery*. Mosby, St. Louis. 1632p.
10. Denny H.R. & Butterworth S.J. 2000. Classification of fractures, p.83-86. In: *Ibid.* (Eds). *A guide to canine and feline orthopaedic surgery*. Wiley-Blackwell, Oxford. 644p.
11. Smith C.W. Feline orthopedics. 1994. *Feline Pract.* 22:16-27.
12. Griffon D.J., Walter P.A., Wallace L.J. Thoracic injuries in cats with traumatic fractures. 1994. *Vet.Comp. Orthop. Traumatol.* 7:10-12.
13. Phillips I.R. A survey of bone fractures in the dog and cat. 1979. *J. Small Anim. Pract.* 20:661-674.
14. McNicholas W.T., Wilkens B.E., Blevins W.E., Snyder P.W., McCabe G.P., Applewhite A.A., Laverty P.H. & Breur G.J. Spontaneous femoral capital physal fractures in adult cats: 26 cases (1996-2001). 2002. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:1731-1736.
15. Harasen G. Atraumatic proximal femoral physal fractures in cats. 2004. *Can. Vet. J.* 45:359-360.
16. Harari J. Treatments for feline long bone fractures. 2002. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 32:927-947.
17. Knecht C.D. 1978. Fractures in cats: A survey of 100 cases. *Feline Pract.* 8:43-6.
18. Harari J. Treatments for feline long bone fractures. 2002. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 32:927-947.
19. Chandler J.C., Beale B.S. Feline orthopedics. 2002. *Clin. Tech. Small An. Pract.* 17:190-203.
20. Johnson A.L. Management of open fractures in dogs and cat. 1999. *Waltham Focus* 9:11-17.

Recebido em: 27/09/2015

Aceito em: 12/08/2016

Comitê de Avaliadores

Adriana Evangelista-Rodrigues
Ailton Vitor Pereira
Alan Maia Borges
Alda Lúcia Gomes Monteiro
Alessandro F. T. Amarante
Alexander Welker Biondo
Alexandre Oba
Alexandre Vaz Pires
Alice Fernandes Alfieri
Alice Maria M. P. Della Libera
Altivo José de Castro
Américo G. da Silva Sobrinho
Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto
Ana Liz Garcia Alves
Ana Paula F. R. L. Bracarense
Ana Terezinha Tavechio
Andrey Pereira Lage
Andrigo Barboza de Nardi
Annelise de Souza Traldi
Antonio Carlos C. Lacrete Júnior
Antonio João Scandola
Antônio Sérgio Ferraud
Antonio Waldir Cunha da Silva
Áureo Evangelista Santana
Bernardete Miranda dos Santos
Bruna P. A. da Fonseca
Bruno Watanabe Minto
Carla Forte Maiolino Molento
Carla Lopes de Mendonça
Carlos Augusto A. Valadão
Carlos Roberto Conti Naumann
Carolina Madeira Lucci
Cassiano Victória
Cecílio Soares Filho
Célia Regina Orlandelli Carrer
Celso A. Rodrigues
Cezinande de Meira
Ciniro Costa
Cláudia Valéria S. Brandão
Cláudio Dias Timm
Claudio Scapinello
Daisy Pontes Netto
Daniel Augusto Barroso Lessa
Delphim da Graça Macoris
Denise Botelho de O. Braga
Dilermando Miranda da Fonseca
Dirlei Antônio Berto
Domingos da Silva Leite
Eduardo Arruda T. Lanna
Eduardo Bagagli
Eduardo Francisquine Delgado
Eduardo Furtado Flores
Eduardo Harry Birgel Júnior
Eduardo Paulino da Costa
Edviges Maristela Pituco
Eliana Curvelo
Eliana Roxo
Eunice Oba
Evelise Oliveira Telles
Fabiano Montiani Ferreira
Felipe Masiero Salvani
Fernanda da Cruz L. e Alvarenga
Fernando Ferreira
Fernando Pandolfo Bortolozzo
Flávia de Rezende Eugênio
Francisco Carlos Faria Lobato
Francisco Leydson F. Feitosa
Frederico Ozanam Papa
Geder Paulo Herrmann
Gustavo Ferrer Carneiro
Helenice de Lima González
Helenice de Souza Spinoso
Iolanda Aparecida Nunes
Ivan Roque de Barros Filho
Ivo Wentz
Jackson Victor de Araújo
Jane Megid
Jean Carlos Ramos da Silva
Jean Guilherme F. Joaquim
Jener Alexandre S. Zuanon
João Carlos Pinheiro Ferreira
João Guilherme P. Filho
João Luiz Horácio Faccini
João Pessoa Araújo Júnior
João Ricardo Dittrich
José Antônio Viana
José Augusto B. Afonso
José Carlos de Andrade Moura
José Dantas Ribeiro Filho
José Domingos Guimarães
José Fernando Machado Menten
José Juradir Fagliari
José Laerte Nörnberg
José Nicolau Prospero Puoli Filho
José Paes de Oliveira Filho
José Roberto Kfoury Júnior
José Roberto Sartori
José Vasconcelos Lima Oliveira
Joselito Nunes Costa
Jovanir I. Müller Fernandes
Juliany Gomes Quitzan
Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Júlio César de Freitas
Kátia Denise Saraiva Bresciani
Laerte Ferreira
Lara Borges Keid
Leandro Rodello
Lílian Gregory
Lisiane de A. Martins
Lissandro Gonçalves Conceição
Luciana Morganti Ferreira Maselli
Luciano José da Costa Figueiredo
Luís Carlos Vulcano
Luís Gustavo Corbellini
Luiz Alberto do Lago
Luiz Augusto do Amaral
Luiz Celso Hygino da Cruz
Luiz Ernani Henkes
Luiz Francisco Zafalon
Luiz Henrique de Araújo Machado
Magda Alves de Medeiros
Marcelo Beltrão Molento
Marcelo George Mungai Chacur
Marcelo Resende de Souza

Marcelo Vasconcelos Meireles
Márcia C. da Sena Oliveira
Márcia Marinho
Marcia Oliveira Lopes
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Márcio Machado Ladeira
Marco A. F. Lopes
Marco Antonio Alvarenga
Marco Antonio Lemos de Oliveira
Marconi Rodrigues de Farias
Marcos Amaku
Marcos Jun Watanabe
Marcos Veiga dos Santos
Margareth Elide Genovez
Maria Angélica Miglino
Maria Cecília Rui Luvizotto
Maria de Lourdes R. S. da Cunha
Maria Denise Lopes
Maria Jaqueline Manprim
Maria Lucia Gomes Lorenço
Maria Lúcia Zaidan Dagli
Maria Luiza Delavechia
Maria Madalena Pessoa Guerra
Maria Terezinha S. Peraçoli
Maria Verônica de Souza
Marília Martins Melo
Mauricio Costa Alves da Silva
Mayra E. O. D'Avila Assumpção
Milton Hissashi Yamamura
Mônica Vicky Bahr Arias
Nei Moreira
Nelson Carneiro Baião
Nelson Moraes
Nereu Carlos Preste
Nilson Roberto Benites
Noeme Sousa Rocha
Pacífico Antônio Diniz Belém
Paulo Alberto Lovatto
Paulo César Ciarlini
Paulo Fernando Machado
Paulo Francisco Domingues
Paulo Henrique Franceschini
Paulo Henrique Jorge da Cunha
Paulo Michel Roehle
Paulo Roberto Brandão
Paulo Roberto de Lima Meirelles
Peterson Triches Dornbusch
Priscilla Anne Melville
Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
Regina Kiomi Takahira
Renato Cesar Sacchetto Tôrres
Renato Silva de Sousa
Renée Laufer Amorim
Ricardo Augusto Mendonça Vieira
Ricardo de Oliveira Orsi
Ricardo J. Del Carlo
Roberta Lemos Freire
Roberto de Oliveira Roça
Roberto Soares de Castro
Rodrigo Martins Soares
Rodrigo Otávio Silveira Silva
Rogério de Paula Lana
Rogério Giufrida
Rogério Martins Amorim
Ronaldo Lopes Oliveira
Rosana M. O. Clark
Rosângela Zacarias Machado
Rosângela Locatelli Dittrich
Rubens Antônio Carneiro
Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Sandra Mara Araújo Crispim
Sebastião de Campos Valadares Filho
Sergio Borges Mano
Sheila Canavese Rahal
Simone Baldini Lucheis
Simone de Carvalho Balian
Simone Tostes de Oliveira
Stefano Hagen
Stélio Pacca Loureiro Luna
Tereza Cristina C. da Silva
Tilde Rodrigues Froes
Valéria Marçal Félix de Lima
Valéria Nobre L. S. Oliva
Vamilton Alvares Santarém
Vanerli Beloti
Vania Maria de V. Machado
Venício José de Andrade
Vera Lúcia M. Hall
Victor Cruz Rodrigues
Virgínia Bodelão Richini Pereira
Wagner dos Reis
Wagner Luis Ferreira
William Koury Filho

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaçamento simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palavras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar **numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página**. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, considerações finais e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique até seis autores seguidos de et al.

1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7 Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE

RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

Prof. Helio Langoni

Revista "Veterinária e Zootecnia"

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SCIENTIFIC PAPERS

Must be prepared according to the following items:

1. Title page:

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

3. The structure of the paper must include:

Introduction: Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

Material and Methods: Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

Results: The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

Discussion: Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

Conclusions: The final synthesis, based on the results and discussion.

References: Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

Examples:

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

References

List the first six authors followed by et al.

1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Conference paper

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6 Dissertation

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7 Electronic material on Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

La Revista **Veterinaria y Zootecnia**, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, publica artículos científicos originales, artículos de revisión de bibliografía, estudios de caso y comunicaciones cortas, relacionadas con las áreas de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, con periodicidad semestral, en las lenguas Portugués, Español o Inglés, siendo los conceptos y opiniones emitidas, de exclusiva responsabilidad de los autores.

La publicación depende de la evaluación preliminar del Presidente del Consejo Editorial, que analiza la relevancia, y los aspectos formales, de acuerdo con la categoría del artículo sometido y las normas editoriales establecidas. Si es aprobado, se adopta el mérito de la evaluación por pares, se envía para dos Revisores, de acuerdo con el área. Los conceptos además de la imparcialidad, serán mantenidos bajo estricta reserva, sin que exista la posibilidad de identificación entre autores y evaluadores. Los artículos no publicados serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados pela página WEB de la revista <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>

Prof. Helio Langoni

Revista “Veterinaria y Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

1. Página principal, con:

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y con espacio entre líneas sencillo iniciando por el “RESUMO”. El “Abstract”, y el Resumen, deben ser fiel traducción del “Resumo”. Independiente da la lengua que el artículo fue presentado deberá contener el resumen en portugués, inglés y español.

- Deben contener como máximo, cinco “palavras-chave” “keywords”, y palabras clave que identifiquen el contenido del texto.

3. La estructura del artículo deberá contener:

Introducción: debe ser clara, objetiva y relacionada al problema investigado, y a la literatura pertinente, así como con los objetivos de la investigación. La introducción establece los objetivos del trabajo.

Materiales y Métodos: debe ofrecer informaciones de reproductibilidad de la investigación, de forma clara y concisa, como variables, población, muestra, equipos, o métodos utilizados, inclusive los estadísticos.

Resultados: Presentación de los resultados obtenidos, que deben ser descritos, sin interpretaciones y comparaciones. Podrá ser bajo la **forma de tablas**, en hojas separadas, con máximo de cinco, ordenadas en algarismos arábigos, y encabezadas por el título, de acuerdo con las normas de presentación tabular de las normas ABNT/WBR 6023/2000 de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas, ABNT, identificadas en el texto como Tabla; bajo la **forma de figuras** en los casos de gráficos, fotografías, dibujos, mapas, etc., ordenadas en algarismos arábigos hasta un máximo de seis, y citadas en el texto como Figura. **Fotografías** pueden ser en blanco y negro o a colores; identificadas con el nombre del autor o autores al lado opuesto. En el caso de **dibujos originales**, la impresión debe ser en papel adecuado, de calidad.

Discusión: Debe ser entendida como la interpretación de los resultados, confrontando la literatura pertinente, descrita en la introducción. De ser conveniente los resultados y discusión podrán ser presentados conjuntamente.

Conclusiones: Es la síntesis final, fundamentada en los resultados y en la discusión.

Referencias: Deben ser presentadas de acuerdo con las normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>), y el arreglo organización debe ser en orden alfabético por apellido del autor (modelos anexos al final).

Deberán ser editados en Microsoft Word for Windows, para edición de textos, Excel (cualquier versión) para gráficos, formato JPEG o GIF (imagen) para fotografías, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), a doble espacio, manteniendo márgenes de 2,5 cm, en las laterales, parte superior e inferior de cada página, fuente Times New Roman, número 12 y numeración consecutiva de las páginas en números arábigos, a partir de la hoja de identificación. Deberán presentar también la numeración en las líneas, recomenzando la cuenta a cada página nueva. Ilustraciones y leyendas deben ser presentadas en hojas separadas.

No se ofrecerán separatas. Los artículos estarán disponibles en el formato PDF en la página WEB de la revista. Para las demás secciones de la revista son válidas las normas anteriores. No deben exceder las 15 páginas. Abreviaturas no usuales, deben ser empleadas después de haber sido escritas por extenso en la primera utilización.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los artículos de la revisión bibliográfica serán publicados en los idiomas portugués, inglés y español, cuando el autor presente contribución científica, importante en el área específica del asunto abordado, y por invitación de los editores.

Deberán contener: Título (portugués, inglés y español), resumen con palavras-chave, abstract con keywords e resumen con palabras claves, introducción, desarrollo del tema, conclusión y referencias. Deberán contener como máximo 20 páginas y 60 referencias (citas bibliográficas).

ESTUDIOS DE CASO

No deben ser subdivididos, como para los artículos. Deben presentar el título en portugués, en inglés y español, resumen con palavras-chave, abstract con key words e resumen con palabras-claves y referencias. Deben contener como máximo cinco páginas, tres tablas o figuras y 15 referencias bibliográficas.

COMUNICACIONES CORTAS

Son relatos con datos inéditos y relevantes de estudios originales, como por ejemplo resultados preliminares de una investigación. Deben ser presentados como máximo en cinco páginas, una tabla y 10 referencias bibliográficas. La estructuración debe respetar las normas para estudios de caso.

REFERENCIAS E CITACIONES

Numerar las referencias consecutivamente según el orden en que se mencionen por primera vez en el texto. En éste, en los cuadros y leyendas, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Abreviar los títulos de las revistas según *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponible en: <http://www.nlm.nih.gov>.

Ejemplos

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referencias

Mencionan los seis primeros autores seguidos de la abreviatura et al.

1 Artículo de periódico

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6 Tesis

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7 Medios electrónicos en Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.